

LA

CONSERVATION DE L'URINE

EN VUE

DE L'ANALYSE CHIMIQUE ET DE L'EXAMEN HISTOLOGIQUE

THÈSE

*Présentée et publiquement soutenue à l'École Supérieure de Pharmacie
de Montpellier*

Le 13 juillet 1917

PAR

Julien COLOMBIER

Né à Beaumont-de-Lomagne (Tarn-et-Garonne), le 5 janvier 1887

PHARMACIEN AIDE-MAJOR DE PREMIÈRE CLASSE

ATTACHÉ AU LABORATOIRE DES CLINIQUES DE L'HÔPITAL SUBURBAIN

EX-PRÉPARATEUR DU COURS DE MATIÈRE MÉDICALE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

JURY : { MM. FONZES-DIACON, *Professeur*, PRÉSIDENT ;
ASTRUC, *Professeur-Adjoint* ;
TARBOURIECH, *Professeur-Agrégé*.

MONTPELLIER

ROUMÉGOUX ET DÉHAN, IMPRIMEURS
rue Vieille-Intendance, 3

1917



École Supérieure de Pharmacie de Montpellier.

ADMINISTRATION

MM. G. MASSOL (I. P. ☉).....	<i>Directeur.</i>
F. JADIN (I. P. ☉).....	<i>Assesseur.</i>
E. IZARD (I. P. ☉).....	<i>Secrétaire.</i>
H. GOT (I. P. ☉).....	<i>Secrétaire honoraire.</i>

PROFESSEURS

MM. L. COURCHET (I. P. ☉).....	{ <i>Histoire naturelle des médicaments</i> <i>Botanique.</i>
G. MASSOL (I. P. ☉).....	<i>Physique.</i>
G. ASTRE (I. P. ☉).....	<i>Chimie générale.</i>
N.....	<i>Matière médicale.</i>
F. JADIN (I. P. ☉).....	<i>Pharmacie.</i>
H. IMBERT (I. P. ☉).....	<i>Chimie analytique et toxicologie.</i>
H. FONZES-DIACON (I. P. ☉).....	<i>Chimie minérale.</i>

PROFESSEUR ADJOINT

M. A. ASTRUC (I. P. ☉).....	<i>Pharmacie galénique.</i>
-----------------------------	-----------------------------

CHARGÉS DE COURS

MM. N.....	{ <i>Botanique cryptogamique.</i> <i>Microbiologie.</i>
P.-J. TARBOURIECH (I. P. ☉).....	<i>Chimie biologique.</i>
M.-A. FAUCON (A. ☉).....	{ <i>Hydrologie.</i> <i>Hygiène.</i>
A. JUILLET (A. ☉).....	<i>Zoologie.</i>
MOYE, prof. Fac. Droit (I. P. ☉).....	<i>Législation pharmaceutique.</i>

AGRÉGÉS

MM. L. GAUCHER (I. P. ☉).
P.-J. TARBOURIECH (I. P. ☉).
M.-A. FAUCON (A. ☉).
A. JUILLET (A. ☉).

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. M.-A. FAUCON (A. ☉).....	<i>Physique.</i>
A. JUILLET (A. ☉).....	<i>Histoire naturelle.</i>
FARRÉ (A. ☉).....	<i>Chimie et Pharmacie.</i>

NOTA. — L'École de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

A LA MÉMOIRE
DE MON PÈRE ET DE MA SOEUR

AUX MIENS

J. COLOMBIER.

AU

DOCTEUR E. DERRIEN

Professeur-Agrégé à la Faculté de Médecine de Montpellier

Chargé du Cours magistral de Chimie biologique médicale

Médecin-Major de 2^{ne} classe

Médecin-Chef du Laboratoire d'analyses médico-militaires
de l'Hôpital Suburbain et de l'Institut biologique

*
**

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

LE DOCTEUR FONZES-DIACON

Professeur de Chimie minérale à l'École de Pharmacie
de l'Université de Montpellier

Pharmacien-Major de 1^{re} classe

Chef du Laboratoire central de la XVI^e Région

J. COLOMBIER.

A LA MÉMOIRE DU

DOCTEUR A. SUIS

Professeur-Adjoint d'Histoire naturelle
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

*
**

A MON MAÎTRE

LE DOCTEUR BRÆMER

Professeur de Matière médicale
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse
Pharmacien-Major de 1^{re} classe
Adjoint au Directeur du Service de Santé de la XVII^e Région
Chevalier de la Légion d'Honneur

J. COLOMBIER.

A MES ANCIENS CAMARADES

du « Stade Toulousain », du « Sporting-Club Albigeois »
et de « l'Émulation Nautique de Toulouse »

**

A MES COMPAGNONS DE L'AMBULANCE 12/16

J. COLOMBIER.

AVANT-PROPOS

Dès le début de notre affectation au Laboratoire des Cliniques de l'Hôpital Suburbain, en juin 1916, nous fûmes amené à constater combien étaient nombreuses les urines qui, destinées à l'analyse, nous parvenaient dans un état insuffisant de conservation.

Cette constatation était toujours vraie pour les urines qui nous étaient expédiées des diverses garnisons de la XVI^e Région. Il devenait très difficile, dans ces conditions, de rédiger un bulletin d'analyse de quelque valeur.

Ce fâcheux état de chose était dû en grande partie aux mauvaises conditions qui président habituellement au prélèvement des urines, à ce qu'elles étaient soumises au voyage sans agent de conservation, ou que l'antiseptique utilisé ne se montrait pas suffisamment efficace.

Le choix de cet antiseptique était d'ailleurs toujours limité à l'emploi de l'un des produits pharmaceutiques d'usage courant : le thymol, le chloroforme, le formol ou le phénol.

Nous avons pu constater que ces agents conservateurs présentaient en même temps qu'une efficacité toujours douteuse, surtout pendant les températures chaudes de l'été, un certain nombre d'inconvénients vis-à-vis des méthodes et des réactifs habituels de l'analyse urinaire. Inconvénients, signalés déjà en grande partie par les divers auteurs des traités d'analyse.

Ces mêmes auteurs ont préconisé, tour à tour, un certain nombre de substances antiseptiques en vue de la conservation de l'urine, mais un choix définitif de l'une d'entre elles n'a pu être établi.

Nous avons donc songé à sélectionner les divers agents de conservation déjà utilisés, à préciser leur action au cours de l'analyse chimique et de l'examen histologique, et à contrôler, enfin, leur efficacité réelle sur les microorganismes de la fermentation ammoniacale. Notre but était de substituer aux diverses « recettes » de conservation de l'urine un procédé fondé sur une

étude critique et expérimentale approfondie, étude qui n'avait été jusqu'ici abordée que très partiellement et parfois partialement. Ce travail ferait l'objet d'une thèse pour le Doctorat en Pharmacie.

Ayant fait part de ce projet à notre Chef de service, M. le Médecin-Major DERRIEN, professeur agrégé à la Faculté de Médecine, nous avons trouvé près de lui des encouragements constants, et nous avons été guidé, pas à pas, dans ce travail de mise au point et de recherches nouvelles.

Nous tenons à le remercier, à cette place, non seulement pour les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer, mais encore pour l'aménité avec laquelle il nous a toujours accueilli et écouté : Nous avons contracté envers lui une dette d'inaltérable gratitude.

Au début de ce travail, nos remerciements vont également à M. le Pharmacien-Major de 1^{re} classe PAU, adjoint au Directeur du Service de Santé de la XVI^e Région, chevalier de la Légion d'Honneur, qui a bien voulu nous affecter auprès d'un laboratoire d'analyses, et dont l'esprit éclairé s'est toujours attaché à confier à des pharmaciens les divers postes où leurs connaissances spéciales en analyse chimique, en hygiène, en bactériologie les rendaient utiles à l'Armée.

M. le Pharmacien-Major de 1^{re} classe FONZES-DIACON, professeur à l'École de Pharmacie, a bien voulu nous faire l'honneur de présider à la soutenance de notre Thèse.

Nous n'oublions pas aussi qu'il nous a initié, comme Directeur du Laboratoire central militaire de la XVI^e Région, aux analyses des denrées alimentaires et aux expertises spéciales.

C'est à ce double titre que nous venons le remercier aujourd'hui.

En acceptant de faire partie de notre jury de thèse, M. le Professeur-Adjoint ASTRUC et M. le Professeur-Agrégé TARBOURIECH ont droit à toute notre reconnaissance ; nous avons été très honoré des marques de sympathie qu'ils ont bien voulu nous témoigner.

Nous tenons également à dire à M. le Professeur JADIN, Pharmacien en chef des hôpitaux civils de Montpellier, combien nous avons été touché du bienveillant intérêt qu'il nous a toujours montré au cours de notre travail.

Montpellier, le 1^{er} juillet 1917.

LA CONSERVATION DE L'URINE

EN VUE
DE L'ANALYSE CHIMIQUE ET DE L'EXAMEN HISTOLOGIQUE

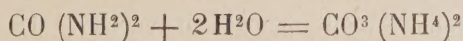
PREMIÈRE PARTIE

LA FERMENTATION DE L'URINE ET SES INCONVÉNIENTS

Abandonnée à elle-même — ceci est un fait de connaissance courante — l'urine perd une partie des caractères qu'elle avait à l'émission.

Très rapidement en été, très lentement en hiver, elle prend un aspect blanchâtre, puis filant, elle « se trouble » et son odeur devient nettement ammoniacale.

L'urine a fermenté. Sous l'influence d'un ferment soluble : l'*Uréase* — sécrété par différents microorganismes et notamment le *micrococcus ureæ* — l'urée qu'elle contenait subit une action hydrolysante et se transforme en carbonate d'ammonium.



Historique de la fermentation ammoniacale

Cette transformation a été rattachée depuis très longtemps aux phénomènes de la fermentation.

Déjà le créateur de la chimie — LAVOISIER — avait observé que « la fermentation, la putréfaction et la combustion rendent perpétuellement à l'air de l'atmosphère et au règne minéral les principes que les végétaux et les animaux en ont empruntés ».

Mais pour LAVOISIER le mécanisme de ces phénomènes est un mystère impénétrable. Les mots de fermentation, de putréfaction ne correspondent dans son esprit à aucune notion précise. Pourtant le problème était posé, et un siècle durant les chimistes et les physiologistes vont chercher à le résoudre.

Le premier, BOERHAAVE, en 1721, considérant que l'ammoniaque est un produit des plus caractéristiques de la putréfaction, a regardé l'urine comme chargée d'une matière excrémentielle extrêmement putrescible.

Après lui, ROUELLE LE JEUNE (1773), CRUISKANT (1798) se livrent aux mêmes recherches; mais c'est à deux savants français, FOURCROY et VAUQUELIN (1), que devait revenir l'honneur de déterminer la forme sur laquelle l'azote est éliminée de l'organisme.

Cette substance, à laquelle ils donnèrent le nom d'*Urée*, se transformait, pour une cause qui leur échappa encore, en carbonate d' AzH^4 et provoquait ainsi l'altération de l'urine.

PROUST (2), puis GAY-LUSSAC devaient successivement s'in-

(1) Fourcroy et Vauquelin. — Premier mémoire pour servir à l'histoire naturelle et médicale de l'urine (*Annales de Chimie.*, t. XXXI, p. 57).

(2) L.-W. Proust. — Faits pour la connaissance des urines et des calculs (*Annales de Chimie et de Physique*, 2^e série, t. XIV, p. 259).

téresser à ces phénomènes. LIEBIG (1) émit la première hypothèse de cette transformation de l'urée qui s'opérait, d'après lui, par le concours du mucus que l'urine renferme et qui se convertit en ferment sous l'influence de l'oxygène de l'air.

Cette première interprétation prévalut de longues années et fut admise par DUMAS (2). Cet illustre savant parvint, en 1830, à fixer l'équation exacte de la réaction, que VAUQUELIN avait vainement cherché à établir. L'urée, en s'assimilant deux molécules d'eau, devenait du carbonate d'ammoniaque.



DUMAS établit également la distinction entre l'altération de l'urée et les phénomènes de putréfaction avec lesquels on la confondait jusqu'alors. Dans un chapitre tout entier de son *Traité de Chimie* (3), il décrit longuement cette fermentation ammoniacale et s'attache à montrer toute son importance.

Reprenant les premières vues de LAVOISIER sur ce cycle perpétuel par lequel rien ne se perd et rien ne se crée, il fut ainsi amené à écrire :

« La fermentation de l'urée joue à coup sûr un grand rôle dans les phénomènes par lesquels la vie végétale et la vie animale se prêtent une mutuelle assistance. C'est en se convertissant en carbonate d' AzH^4 par la fermentation que l'azote devient propre à servir d'aliment aux plantes. »

A la suite de DUMAS, JACQUEMART (4), MÜLLER (5) s'ingéniè-

(1) Liebig. — *Traité de chimie organique* (Introduct., p. 29).

(2) Dumas. — Sur la composition de l'urée (*Annales de Chimie et de Physique*, 2^e série, t. XLIV, p. 273. 1830).

(3) *Traité de chimie*, t. VI, p. 380.

(4) Jacquemart. — *Ann. de Chimie et de Physique*, 3^e série, t. VII. 1843.

(5) Müller. — *Journal für prakt. chemie*, t. LXXXI, p. 467.

rent à rechercher les causes de cette fermentation, mais il appartenait au grand chimiste français, à qui nous sommes redevables des grandes découvertes microbiologiques du siècle dernier, à PASTEUR, de dévoiler les mystères de la fermentation en général, et de la fermentation ammoniacale en particulier.

Il montra que ces phénomènes cachaient tout un monde nouveau, le monde des infiniment petits. Eux seuls étaient les agents actifs de la dégradation de la matière organique, et, par leur intermédiaire, toutes les substances fermentescibles confiées à la terre se minéralisent ou se gazéifient et reprennent l'état sous lequel les végétaux les avaient absorbées : elles redeviennent aptes à l'entretien de la vie.

C'est ainsi que PASTEUR démontra l'existence d'un petit végétal microscopique qui était le véritable agent de la transformation de l'urée en carbonate d'ammoniaque.

Ses travaux sur l'origine des ferments et sur la génération dite spontanée seront célèbres de tous les temps. Il est bon de rappeler ici sa communication (1) à l'Académie des Sciences, le 30 avril 1860. C'est dans cette séance mémorable que PASTEUR décrivit ses premières expériences. Dans un ballon renfermant de l'urine stérilisée par une ébullition prolongée et soumis pendant plusieurs jours à l'étuve à 30° sans que la moindre altération se produise, il introduit un peu d'amiant chargé des poussières de l'air. Le col du ballon refermé à la lampe, l'urine est à nouveau soumise à l'étuve.

Après 36 heures, l'urine renfermait des produits organisés de différentes espèces, principalement des bactéries. L'urine devenait de plus en plus ammoniacale, et l'urée disparaissait sous l'influence d'un véritable ferment organisé dont les ger-

(1) Pasteur. — Comptes rendus de l'Académie des Sciences, t. L, p. 850. 1860.

mes ne pouvaient avoir été apportés que par les poussières de l'air.

PASTEUR décrivit ce *micrococcus*, qui se présentait sous le microscope, en chapelets à petits grains, le désigna sous le nom de *torule ammoniacale*, et le classa parmi les *champignons* de la famille des *torulacées*.

Reprenant les premières expériences de PASTEUR, un de ses élèves, VAN TIEGHEM (1), retrouva ce microorganisme, le décrivit à son tour, mais avec quelques variantes, et démontra définitivement l'inanité de l'hypothèse du mucus vésical devenant ferment au contact de l'air.

PASTEUR encore, GOSSELIN et A. ROBIN (2) se livrèrent à de nouvelles recherches, et vinrent affirmer que l'urine saine ne renfermant jamais la torulacée, la fermentation ammoniacale ne pouvait se produire à l'intérieur de la vessie que par l'intromission pour une cause quelconque — le plus souvent par le cathétérisme avec des sondes mal nettoyées — des germes du redoutable ferment.

En 1872, le professeur COHN (3), de Breslau, vint vérifier et confirmer les découvertes de PASTEUR et de VAN TIEGHEM. Il décrivit la torulacée des deux savants, mais la désigna sous le nom de *Micrococcus Ureæ*. Il la classa parmi les *algues oscillariées*.

Les choses en étaient là lorsqu'en 1876, un chimiste de Strasbourg, MUSCULUS (4), vint s'élever contre les nouvelles

(1) Van Tieghem. — *Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique* (Thèse de la Faculté des Sciences, Paris. 1864).

(2) Gosselin et Robin. — L'urine ammoniacale et la fièvre urineuse (*Arch. de Méd.*, p. 530. 1874).

(3) Cohn. — *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, t. II, p. 158. 1872.

(4) Musculus. — *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. LXXXII, p. 333. 1876.

théories émises par PASTEUR et ses élèves. Il montra que le mucus vésical retiré de certaines urines, précipité par l'alcool, puis lavé et desséché, était le véritable agent de la transformation de l'urée. Toutes les urines d'ailleurs ne sont pas aptes à fournir du ferment. — D'après cet auteur, il en est même que l'on peut laisser à l'air en été pendant plusieurs mois, sans qu'elles entrent en fermentation ammoniacale. Les urines les plus riches en ferment étant les urines épaisses et filantes rendues par des malades atteints de catarrhe de la vessie. — Lorsque l'on examine au microscope ce mucus desséché, on ne lui retrouve aucun des caractères du ferment organisé. Il a beaucoup de ressemblance, par contre, avec les ferments solubles : telles que les diastases de la salive ou du suc pancréatique.

Avec MUSCULUS réapparaissait donc l'idée ancienne du mucus-ferment, mais surtout comme processus de l'épithélium vésical malade.

A peine le travail de MUSCULUS avait-il paru que PASTEUR, en collaboration avec JOUBERT (1), se mirent en devoir de contrôler les assertions qu'il renfermait, et, dans un magistral exposé de la question, au cours d'une séance à l'Académie des Sciences, vinrent donner les résultats de leurs recherches et apporter leurs conclusions. Le ferment soluble de MUSCULUS existait en réalité, mais il était produit par le petit végétal microorganisé de l'urée. Cette diastase était sécrétée par un être vivant.

Quelques jours plus tard, d'ailleurs, PASTEUR précisait devant l'Académie de Médecine cette première communication et, les preuves à l'appui, démontrait définitivement : 1° que l'urée n'est pas nécessaire à la production du fer-

(1) Pasteur et Joubert. — Compt. rend. de l'Académie des Sciences, t. LXXXIII, p. 5. 1876.

ment organisé ; 2° que le ferment peut prendre naissance dans un tout autre milieu que l'urine en dehors de toute présence de mucus vésical.

Donc, après les remarquables travaux de PASTEUR et VAN TIEGHEM, soulignés par COHN, on admettait généralement qu'un microorganisme seul, le *micrococcus ureæ* provoquait le phénomène chimique de la transformation de l'urée en carbonate d' AzH^4 et qu'il ne pouvait se produire en dehors de la présence du petit végétal.

Dès l'année 1878, MIQUEL (1) montra que cette hypothèse n'était pas fondée, et vint affirmer qu'il existait des *bactéries* en forme de *bâtonnets*, capables d'accomplir la fermentation ammoniacale avec autant et même plus d'énergie que la *torulacée* de PASTEUR et VAN TIEGHEM.

C'est en 1879 que MIQUEL décrivit pour la première fois un nouveau ferment de l'urée, qu'il avait isolé de l'eau d'égout, puisée au collecteur de Clichy.

Ce *ferment bacillaire* différait complètement par l'aspect de la torule ammoniacale, le *micrococcus* de Cohn. Il le désigne sous le nom de *bacillus ureæ*.

Sept années après que MIQUEL eut décrit et rangé le *bacillus ureæ* parmi les ferments les plus actifs de l'urée, LEUBE (2) retrouvait de nouveau cette espèce et s'attribuait la priorité de la découverte. Priorité d'ailleurs reconnue par FLÜGGE et d'autres auteurs allemands.

Qu'il nous soit permis de signaler devant ces deux exemples pris dans le domaine de la science, le *diplocoque* de PASTEUR, revenu en France sous le nom de *Micrococcus U.* de

(1) Miquel. — *Bulletin de la Société chimique de Paris*, t. XXIX p. 387 et t. XXXI-XXXII, p. 391.

(2) Leube. — *Virch. Archives*, 13 d. 100, p. 540. 1885.

COHN, le *bacillus ureæ* découvert par MIQUEL et revendiqué par LEUBE : combien il en a été souvent de même dans le domaine des arts ou de l'industrie ! C'est ainsi qu'un grand nombre de découvertes françaises ont été usurpées de l'autre côté du Rhin, travesties quelquefois grossièrement, et nous ont été rendues avec l'étiquette « *Made in Germany* ».

Depuis cette époque on a décrit un grand nombre de microorganismes urophages.

LEUBE a signalé un nouveau *bacillus ureæ* γ , FLÜGGE (1) un *micrococcus ureæ liquefaciens*, mais c'est surtout MIQUEL qui s'est spécialisé dans la recherche des agents susceptibles d'hydrater l'urée.

Déjà en 1890 (2), dans un compte rendu à l'Académie des Sciences, il déclarait en cultiver une quarantaine d'espèces, de caractères morphologiques parfaitement distincts et de puissance d'action variable. Dans ce nombre, il ne comprenait pas certaines *mucidinées* qui peuvent également transformer l'urée en carbonate d' AzH^4 .

Dans une remarquable étude sur la fermentation ammoniacale et les ferments de l'urée, parue en 1898, le même auteur (3) étudie les divers *microphytes urophages*, ainsi que leurs caractères et propriétés. Il les divise en deux grandes tribus, les *champignons* et les *bactériens* ; et, pour distinguer ces microbes de leurs congénères, il propose de les désigner sous l'expression générale d'*urobactéries*.

(1) Flügge. — *Les microorganismes* (Traduit par le Dr Hervejean, p. 130. Edit. 1887).

(2) Miquel. — *Compte rendu Acad. Scienc.*, t. III, p. 397. 1890.

(3) *Étude sur la fermentation ammoniacale et les ferments de l'urée* (Paris. 1898).

Voici le cadre général dans lequel il les fait entrer :

Ferments de l'Urée	{	1° CHAMPIGNONS UROPHAGES.	{	<i>Urobacilles.</i>
		2° BACTÉRIENS UROPHAGES...		<i>Urocoques.</i> <i>Urosarcines.</i>

Finalement, MIQUEL arrive à cette conclusion : Les ferments ammoniacaux appartiennent tant à l'ordre des *bactéries* qu'à l'ordre des *champignons inférieurs*. Ils agissent sur l'urée par l'intermédiaire d'un *ferment soluble* (celui découvert par MUSCULUS) qu'il arrive à isoler et qu'il dénomme « l'*Urase* ».

C'est la théorie admise de nos jours : l'urine normale estensemencée par les germes apportés par les poussières de l'air, ou encore par les débris préputiaux ou vulvaires (SALKOWSKI) (1). Le plus souvent elle se contamine complètement dans les vases chargés de la recueillir. Des microorganismes se développent alors dans cet excellent milieu de culture ; le plus fréquent est certainement le *micrococcus U.* (COHN) ou *urobacillus Pasteurii* (MIQUEL). Rapidement, pour peu que la température soit favorable, des modifications diverses se produisent.

Sous l'influence du ferment soluble, l'*uréase* (2), sécrété par ces divers microorganismes, l'urée subit une action hydrolysante et se transforme en carbonate d' AzH^4 :



D'après NEUBERG (3), le carbonate d' AzH^4 formé, de par sa

(1) Salkowski. — Leube : *Die Lehre von Harn* (S. 6, Berlin. 1886).

(2) Dénomination due à Bourquelot (Thèse agrég., Paris. 1889).

(3) C. Neuberger. — *Der Harn*, T. I, p. 39. Berlin. 1911.

nature très instable, se dissocie en partie en carbamate d' AzH^4 .



mais aussi en acide carbonique et ammoniacque :



Et c'est ainsi que se « boucle » le cycle de l'azote.

Grâce aux infiniment petits, retourne au sol, sous forme d'ammoniacque, un azote précieux pour l'agriculture, que MIQUEL estime pour la seule population de la France à 130 millions de kgs par an.

NÉCESSITÉ D'UNE BONNE CONSERVATION

L'urine ayant ainsi subi la fermentation ammoniacale est en partie impropre à l'analyse.

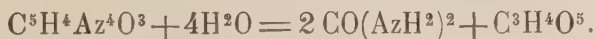
Inconvénients de la fermentation pour l'étude des constituants normaux

La détermination, en effet, des caractères organoleptiques et des propriétés physiques n'est plus possible. La plupart des composés chimiques sont transformés ou détruits.

En premier lieu, l'aspect est notablement modifié ; ce n'est plus qu'un liquide trouble, visqueux, d'une couleur incertaine. L'odeur *sui generis*, légèrement aromatique, est devenue ammoniacale et fétide. L'urine laisse déposer, dans ces conditions, un abondant précipité cristallin.

En dehors des caractères organoleptiques, cette fermentation vient apporter des modifications notables aux caractères chimiques de l'urine : La présence d'une certaine quantité de car-

bonate d'ammonium fortement alcalin vient changer de signe la réaction normalement acide. Ainsi que nous l'avons déjà montré, l'urée est en grande partie détruite, l'acide urique se combine à l'ammoniaque libéré et précipite à l'état d'urate acide d'ammonium. D'après GÉRARD (1), certains microorganismes peuvent même décomposer totalement l'acide urique en urée et acide tartronique. Cette transformation serait le résultat d'une hydratation qui répondrait à l'équation suivante :



Nous retrouvons également précipités les phosphates terreux à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien. La créatine se transforme en créatinine.

Inconvénients de la fermentation pour l'étude des constituants anormaux

Les erreurs d'analyses peuvent être plus graves lorsqu'il s'agit de rechercher ou de doser certains constituants pathologiques dans des urines mal conservées.

Pour n'indiquer, dans ce bref résumé, que les deux cas les plus importants, nous ne citerons que les urines à albumine et à glucose.

La recherche de l'albumine, en effet, doit toujours être effectuée avec un liquide très limpide. L'urine ammoniacale est toujours trouble, c'est en vain qu'on la filtrera par les moyens ordinaires, les bactéries ne seront pas arrêtées et

(1) E. Gérard. — Compt. rend. Acad. Scienc., t. CXXII, p. 1019, et t. CXXIII, p. 185. 1896.

donneront au liquide un louche persistant qui gênera considérablement pour déceler ou doser l'albumine par les diverses méthodes généralement employées (Coagulation par la chaleur en liqueur acide. Réaction de HELLER. Dosage diaphanométrique de DENIGÈS). La réaction fortement alcaline devra être modifiée pour l'emploi du réactif d'ESBACH. Enfin, tout comme l'urée, l'acide urique, la créatine, l'albumine est hydrolysée et son taux diminue.

Il en est de même pour les urines fermentées renfermant du glucose, dont la recherche et le dosage sont effectués à la liqueur de FEHLING. L'ammoniaque déplacée par la soude du réactif cuprique pouvant dissoudre l'oxyde cuivreux formé.

Mais nous avons vu, en outre, ainsi que l'a montré PASTEUR au cours de ses premières expériences, que l'urine est un excellent milieu de culture microbienne.

D'autres microorganismes que ceux fabriquant l'uréase peuvent s'y ensementer et proliférer et détruire alors, s'ils s'y trouvent, les corps aux dépens desquels ils ont coutume de subsister.

C'est ainsi que dans les urines des diabétiques, le *Saccharomyces cerevisiæ* exercera son action habituelle. Transformant le sucre en alcool et acide carbonique, il diminuera ainsi le taux du glucose primitif jusqu'à le faire disparaître en totalité.

Mais si pour la recherche de l'albumine on peut se débarrasser par la centrifugation des bactéries qui troublent avec insistance le liquide filtré, si en portant à l'ébullition avec un excès de soude l'urine fermentée on peut chasser l'ammoniaque et utiliser ainsi la liqueur de FEHLING pour la recherche du sucre, le mal est sans remède lorsqu'il s'agit de se livrer à l'examen microscopique du sédiment urinaire.

Impossibilité de l'étude histologique

Tous les éléments histologiques anormaux qui pouvaient s'y trouver disparaissent au cours de cette putréfaction. Très rapidement, leur altération est si profonde et telle est leur importance au point de vue diagnostic, qu'il devient impossible de les signaler d'une façon certaine. Les leucocytes, les hématies, les cellules épithéliales diverses et surtout ces formations microscopiques si fragiles que sont les cylindres urinaires sont détruits par la fermentation ammoniacale. Bien plus, l'examen du sédiment n'est d'aucun intérêt, puisqu'on n'y retrouve plus les éléments figurés pouvant exister à l'émission, mais des produits de fermentation comme l'urate acide d'ammonium et le phosphate ammoniaco-magnésien, ou encore des colonies de microorganismes.

Importance générale d'une bonne conservation

Il est donc de toute nécessité de remettre au chimiste, afin de lui permettre d'établir un bulletin exact d'analyse, une urine bien conservée, présentant tous les caractères, physiques, chimiques et histologiques, qu'elle avait à l'émission.

Nous avons pu nous rendre compte de très près, en effet, pendant notre affectation au laboratoire des Cliniques de l'Hôpital Suburbain, de toute l'importance que revêt l'analyse d'urine et de quelle singulière façon elle vient éclairer le diagnostic du clinicien ou du chirurgien en vue du traitement, du régime alimentaire et de l'intervention chirurgicale.

La conservation de l'urine aux fins d'analyse s'impose parce qu'en dehors du dosage ou de la recherche des éléments

normaux ou pathologiques, il est déjà nécessaire de pouvoir décrire le liquide tel qu'il se présente à la sortie de la vessie.

L'aspect, l'odeur, la réaction de l'urine sont déjà pour le médecin un excellent moyen d'exploration clinique. Chauffée, après agitation, à 30-40°, l'urine doit pouvoir reprendre son aspect premier, car il est de toute importance de savoir si elle était trouble à l'émission. L'odeur, la réaction permettront dans une certaine mesure de fournir une première indication sur la nature de l'affection dont est atteint le malade. Nous ne pouvons passer ici sous silence l'importance que quelques auteurs reconnaissent au signe de la réaction et à la détermination de l'acidité. Sous le nom d'uro-réaction, MALMÉJAC (1) a donné un procédé destiné à faire le diagnostic précoce de tuberculose. L'urine des tuberculeux est généralement acide, dans la tuberculose rénale même elle est souvent hyperacide : or cette acidité se maintiendrait, d'après l'auteur, beaucoup plus longtemps que dans une urine normale ; bien plus, elle irait en augmentant.

Sans vouloir entrer dans la discussion de la valeur clinique de ce procédé, il est bon de faire remarquer cependant qu'il est nécessaire, pour pouvoir établir un diagnostic de quelque valeur, de mettre l'urine à l'abri des microorganismes qui pourraient venir s'y ensementer et diminuer ou tout au moins enrayer l'augmentation de l'acidité.

Nous rappellerons également la nécessité des dosages exacts à intervalles réguliers du sucre et de l'albumine pour suivre, chez certains malades, l'évolution des glycosuries compliquées quelquefois d'acétonurie, et des néphrites aiguës ou chroniques.

(1) Malméjac. — L'uro-réaction-diagnostic précoce de la tuberculose (*Presse Méd.*, 22 septembre 1909).

C'est pour l'observation des néphrites que se place surtout l'obligation du choix de l'antiseptique additionné à l'urine, permettant de se livrer dans les meilleures conditions possibles à l'examen histologique lorsque celui-ci ne peut être pratiqué dès l'émission. L'examen du sédiment est au moins aussi important que l'analyse chimique. Plusieurs praticiens même lui accordent une préférence marquée.

La présence de pus, le nombre des hématies, la qualité des cylindres urinaires, l'aspect des cellules rénales, permettent d'apprécier en partie la gravité de la lésion rénale.

Si dans certains cas, dont le médecin traitant est seul juge, la recherche de quelques éléments pathologiques et l'examen microscopique du sédiment peuvent être pratiqués sur l'urine fraîche provenant d'une seule émission, il n'en est plus de même lorsqu'il s'agit de se livrer à l'analyse quantitative des constituants normaux ou anormaux, de dresser le bilan des divers composés azotés de l'urine ou encore d'établir les rapports urologiques qui viennent nous renseigner sur la valeur fonctionnelle de certains organes, et sur les troubles qui peuvent survenir dans les phénomènes de la nutrition.

L'analyse doit être rigoureusement pratiquée alors sur un échantillon prélevé sur le mélange de toutes les émissions de 24 heures.

Cette recommandation est d'une importance capitale : « L'urine que nous sécrétons, ainsi que le fait remarquer si judicieusement LABAT (1), n'est jamais semblable à elle-même à tous les instants de la journée ; sa composition varie avec toutes les périodes biologiques où nous nous trouvons. Elle est, en somme, à chaque moment le reflet de la phase phy-

(1) Labat. — *Encyclopédie française d'urologie*, t. I, 3^e partie, Paris. 1914).

siologique que nous traversons ». C'est pourquoi, si on ne pratique pas l'analyse sur le mélange des différentes émissions du cycle vital que représente la journée de 24 heures ; si, d'autre part, ce volume n'est pas exactement mesuré et connu, les résultats de l'analyse peuvent être nuls et parfois même dangereux. — DENIGÈS (1), notamment, a signalé un exemple typique d'erreur qui peut se produire chez les diabétiques.

Il faut donc recueillir les urines de 24 heures pour obtenir des résultats qui aient une valeur réelle. Mais pour que l'urine garde tous ses caractères primitifs pendant ce laps de temps, il est de toute nécessité, l'été surtout, d'avoir recours à un moyen de conservation, le plus souvent par l'addition d'un antiseptique.

Conservation indispensable pour la détermination exacte des plus importants rapports urologiques

Dans ces conditions seulement, le chimiste pourra établir avec certitude les rapports urologiques dont nous parlions dans l'un des paragraphes précédents, et qui sont susceptibles d'être plus spécialement faussés du fait de la fermentation ammoniacale.

Il en est deux notamment sur lesquels nous insisterons plus particulièrement, parce qu'ils sont en général en grand honneur dans le monde médical, et aussi parce que leurs éléments de données sont les plus touchés par l'action diastatique des microorganismes. Nous voulons parler du rapport $\frac{\text{azote d'urée}}{\text{azote total}}$ (rapport azoturique) et du rapport $\frac{\text{azote formol}}{\text{az. amm. total de FOLIN}}$

(1) Denigès. — *Chimie analytique*, 4^e édit., p. 1124.

coefficient d'imperfect. uréogénique de L. MAILLARD (1),
coefficient d'acidose total de LANZENBERG (2).

Il y a quelques années, le Congrès de Chimie appliquée (Section IX) remplaçait la dénomination de coefficient des oxydations azotées par celle de rapport azoturique. Ce rapport est fourni par le quotient $\frac{NU}{NT}$ et, normalement, il oscille entre 0.84 et 0.85. Ce qui correspond à admettre que l'azote de l'Urée représente 84 à 85 o/o de l'Azote total. Toute influence de régime mise à part, on peut donc arriver à la déduction suivante : A une diminution d'urée correspondra une baisse du coefficient azoturique, et il faudra en rechercher les causes dans un trouble de la nutrition à préciser par d'autres recherches.

Ce rapport est certainement le plus fréquemment demandé au chimiste. Il est de toute évidence qu'il ne peut être établi avec quelque valeur que si l'urine est bien conservée. Sous l'influence de la fermentation ammoniacale, en effet, le dénominateur ne peut changer que d'une façon imperceptible : Il peut se produire une légère perte d'ammoniaque. Mais il n'en est pas de même du numérateur : L'urée se transforme en partie en carbonate d'ammoniaque. Le coefficient de ce fait diminue sensiblement ; mais la nutrition du malade n'est plus en cause, les *micrococci* sont les seuls coupables.

L'erreur tient à ce fait que pour établir le rapport azoturique, on détermine l'urée par la méthode RONCHÈSE, c'est-à-dire qu'à l'urée obtenue après défécation au sous-acétate de

(1) L. Maillard. — *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, t. II, p. 205. 1909.

(2) Lanzenberg. — *L'Ammoniaque et l'urée*. Etude du coefficient d'acidose (Thèse Faculté méd. Paris, juillet 1912).

plomb, au moyen de l'hypobromite de soude on retranche l'ammoniaque donné par un procédé dû au même auteur, procédé qui consiste à libérer par le formol les acides des sels ammoniacaux de l'urine.

Ce que nous venons de dire peut être répété pour le second rapport urologique sur lequel nous avons jugé également d'insister.

Ce rapport qui résulte des travaux de L. MAILLARD et de ceux de LANZENBERG, a été simplifié d'ailleurs à juste raison par E. DERRIEN (1) qui l'exprime par la formule suivante :

$$\frac{\text{N titrable au formol}}{\text{N titrable à l'hypobromite}}$$

Toute la valeur de ce rapport est basée sur ce que l'*Azote non uréifié* (azote qui échappant à la transformation en urée est venu neutraliser en partie les acides sulfuriques phosphorique, etc. = *azote formol*) est sensiblement dans la proportion de 6 pour 100 dans l'*azote uréifiable* (Indice hypobromique défectué = *Azote hypobromique*).

Il est facile de démontrer que si, sous l'action des microorganismes, le dénominateur reste le même, le numérateur augmente dans des proportions considérables et vient fausser totalement le résultat.

L'urine, *dès la moindre fermentation ammoniacale*, est absolument impropre à l'établissement du coefficient d'imperfection uréogénique de MAILLARD.

C'est cependant l'un des meilleurs enseignements que la chimie de l'urine puisse nous donner sur l'activité biologique

(1) E. Derrien. — Sur l'indice formol et sur le rapport de l'indice formol à l'indice hypobromique en chimie urinaire courante (*Bulletin Soc. chimiq. France*, 4^e série, t. XIII, p. 97. 1913).

de certains organes et principalement sur la valeur fonctionnelle du foie, et c'est ainsi que, pour notre part, nous l'avons vu souvent demander au laboratoire des Cliniques de l'Hôpital Suburbain, avant l'injection par voie intraveineuse de l'une des préparations arsénoïques pour le traitement de la Syphilis.

Toutefois que l'organisme sera menacé d'une intoxication acide comme dans le diabète, comme dans certaines maladies infectieuses, une forte quantité d'ammoniaque sera employée à neutraliser les acides non brûlés et viendra combattre ainsi cette acidose. Le coefficient de MAILLARD augmentera de ce fait, comme il augmentera dans l'ammoniurie, dans les fièvres, dans l'inanition. Il diminuera, au contraire, dans le régime lacté et sous l'influence des traitements alcalins et dans les cas de déminéralisation.

Nous ne saurions passer sous silence, dans ce bref exposé, la valeur que plusieurs urologistes, et notamment les chirurgiens de l'hôpital Necker, reconnaissent à la constante uréo-sécrétoire établie par AMBARD (1).

$$K = \frac{\text{Urée du sang}}{\sqrt{\text{débit urée} \times \frac{70}{\text{poids}}} \sqrt{\frac{\text{concentration urée}}{25}}}$$

Il est certain que, pour établir cette constante, une certaine technique doit être observée et que seul le chirurgien peut réaliser. Dans la généralité des cas, ce dernier a à sa disposition le laboratoire de la clinique ou de l'hôpital où les deux dosages d'urée dans l'urine et dans le sérum peuvent être effectués rapidement ; mais nous ne croyons pas sortir de notre sujet en indiquant dans l'un des chapitres suivants le

(1) Ambard. — *Physiologie normale et pathologique des reins*. 1914.

moyen permettant de conserver d'une façon certaine, non seulement l'urée de l'urine, mais encore celle du sérum, et cela pendant une période plus ou moins longue, malgré une température élevée et pouvant permettre, si le besoin se présente, l'expédition des 2 échantillons.

Importance actuelle au point de vue militaire

Nous terminerons enfin cette première partie de notre travail, en signalant toute l'importance que revêt l'analyse exacte et précise de l'urine en matière de réforme militaire et dans la recherche des simulations possibles.

Ainsi que nous l'avons pu constater, comme assistant du médecin chef des laboratoires de chimie de la Faculté de Médecine affectés aux analyses médico-chimiques militaires de la XVI^e région, si, dans bien des cas, il est déjà difficile d'affirmer, dans des urines fraîchement émises, la présence de certains éléments anormaux et d'en vérifier l'origine, il devient alors impossible de se prononcer avec des urines mal conservées, ayant quelquefois voyagé ou, plus simplement, recueillies sans précautions dans des récipients souillés. L'analyse, dans ces derniers cas, n'est plus permise, puisque le chef de service doit rédiger un bulletin, qui peut conduire l'intéressé soit vers le conseil de réforme, soit vers le conseil de guerre.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE CRITIQUE DES ANTISEPTIQUES PRÉCONISÉS CONTRE LA FERMENTATION AMMONIACALE

Premières recherches expérimentales et cliniques

Dans l'étude qui va suivre des divers agents de conservation proposés pour empêcher la fermentation ammoniacale, les premiers en date furent signalés comme susceptibles de modifier les propriétés du ferment de l'urée, mais en dehors de toute idée d'analyse.

Déjà VAN TIEGHEM avait montré l'influence nuisible qu'exercent sur le développement de la *Torule ammoniacale* l'oxyde et le bichlorure de mercure, l'acétate de cuivre. Mais il ne faisait suivre cette indication d'aucun commentaire. Il ajoutait simplement que l'essence de térébenthine n'empêche la fermentation qu'à très haute dose:

Plus tard, MUSCULUS, après avoir découvert son ferment soluble, étudiait les diverses influences chimiques susceptibles de le modifier. Il signala l'action destructive des acides en général. Mais il attira plus spécialement l'attention sur ce fait que l'acide phénique était impuissant à entraver la fermentation. Les alcalis n'agissaient qu'en solution concentrée.

PASTEUR et, après lui, de nombreux médecins voulurent transporter dans le domaine de la clinique ces données expérimentales.

PASTEUR proposa, — ayant vérifié à son tour l'insuccès de l'acide phénique, — l'emploi de l'acide borique pour combattre la fermentation ammoniacale intra-vésicale, qui, d'après lui, provenait de l'intromission dans la vessie de la *torulacée* par les instruments habituels du cathétérisme.

Nous n'avons pas à décrire ici les expériences qui furent tentées par le professeur GUYON et ses élèves à la suite des travaux de PASTEUR, ni les nombreuses discussions qu'ils soulevèrent au sujet de l'origine de l'ammoniurie, ni les unes ni les autres ne sont, de plus, de notre compétence, mais nous nous devons de les signaler, parce qu'elles sont le point de départ des premières tentatives d'essais de substances médicamenteuses antifermentescibles.

Dans une thèse pour le doctorat en médecine, soutenue en 1883, GUIARD (1) passe en revue les divers antiseptiques susceptibles d'être employés avec succès.

Après s'être livré à de nombreuses expériences sur des urines normales additionnées d'une petite quantité d'urine en fermentation, avec des doses variables de médicaments, il a pu arriver aux conclusions suivantes :

Ni les acides minéraux, ni le sublimé, ni le salicylate de soude, ni le sulfate de cuivre, ni la glycérine, ni même l'acide borique ne tuent le ferment. Ils contrarient son action et la retardent à des degrés divers, mais c'est tout. Le nitrate d'argent est l'agent qui, aux doses les plus faibles, a eu l'action la plus énergique. Une solution à 1 pour 200 suffit pour empêcher aussi complètement que possible la fermentation.

GUIARD a démontré d'ailleurs que ces propriétés du nitrate d'argent se retrouvent dans l'application clinique.

(1) Guiard. — *Etude clinique et expérimentale sur la transformation ammoniacale des urines* (Thèse de la Faculté Méd. Paris. 1883).

Alexandre MÜLLER (1) devait s'intéresser quelques années plus tard aux diverses substances susceptibles d'empêcher l'altération microbienne de l'urine. Il s'est appliqué à déterminer les quantités d'antiseptique nécessaires pour obtenir une bonne conservation. Il a essayé les divers acides minéraux et organiques, indiqués déjà par MUSCULUS comme incompatibles avec la vie du ferment, les médicaments signalés par GUIARD et tous les antiseptiques en général.

Antiseptiques préconisés en vue de l'analyse de l'urine

La plupart des substances étudiées par le chimiste allemand sont inutilisables pour la conservation de l'urine aux fins d'analyse. Le plus grand nombre d'entre elles, en effet, n'agissent, comme l'acide salicylique par exemple, qu'à des doses trop élevées (10 grammes) ou encore ont une action sur les réactifs habituels de l'analyse urinaire. MÜLLER indique cependant que le phénol à la dose de 1 gramme par litre, le thymol 2 grammes en solution alcoolique peuvent assurer une bonne conservation de l'urine.

Entre temps, les divers auteurs de traités d'analyse, signalant les inconvénients de la fermentation ammoniacale, proposaient tour à tour plusieurs agents de conservation, parmi lesquels revenaient le plus souvent le phénol, le chloroforme, le fluorure d'ammonium.

C'est alors que parut le remarquable travail de HUGUET (2)

(1) A. Müller. — *Landwirts. Versuchst.*, t. XXXII, p. 271. 1886.

(2) Huguet. — Sur la conservation des urines (*Journal de Pharmacie et de Chimie*, t. XXIX, p. 217. 1894).

sur la conservation des urines à l'aide des sels de mercure. L'excellent professeur de chimie de l'École de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand reproche aux divers antiseptiques déjà conseillés par plusieurs chimistes et se rattachant, pour la plupart, aux corps de la série aromatique (naphtol, salol, A. salicylique), de n'être que très peu solubles ou de n'être efficaces qu'à des doses relativement trop élevées. Ils agissent de plus sur quelques-uns des réactifs habituellement utilisés dans les analyses urologiques, notamment le chlorure ferrique.

Il élimine ensuite le fluorure d'ammonium, qui augmente l'acidité propre de l'urine, et le chloroforme, qui masque l'odeur et, de plus, trouble les réactions de la liqueur de FEHLING. Il fait grief surtout au chloroforme de n'avoir assuré, au cours d'essais expérimentaux, qu'une conservation de très faible durée et de donner surtout des produits de décomposition très nombreux affectant les réactifs les plus importants.

HUGUET, dans une deuxième série d'analyses, s'est adressé aux sels de mercure et a opéré, pour juger de leur valeur respective, sur une urine albumineuse (2 gr. 10 par litre) et renfermant un grand nombre d'hématies.

Il a employé comparativement l'iodure, le chlorure et le cyanure mercuriques. Tous les trois lui ont donné des résultats satisfaisants. En fin de compte, il propose d'introduire dans un flacon parfaitement propre et susceptible de contenir la totalité des urines de 24 heures 2 cm³ de l'une des solutions suivantes :

1° HgCl ²	10 gr.
NaCl	1 gr.
Eau dist. q. s. pour.....	100 cm ³ .

2° HgI ²	5 gr.
KI.....	10 gr.
Eau dist. q. s. pour.....	100 cm ³ .
3° HgCy ²	10 gr.
Eau dist. q. s. pour.....	100 cm ³ .

HUGUET s'est basé dans ces expériences pour apprécier le pouvoir de conservation des divers antiseptiques sur les dosages successifs de l'acidité apparente de l'urine vis-à-vis de la phénolphtaléine exprimée en centicubes de solution décimale de soudé.

C'est ainsi qu'il a pu constater que cette acidité diminuait très rapidement dans les urines conservées au chloroforme; avec les sels de mercure, au contraire, l'acidité ne s'est modifiée qu'au bout du septième jour.

M. le Professeur HUGUET, à qui nous avons demandé si depuis cette époque, déjà lointaine, il n'avait publié rien d'autre sur ce sujet, nous a répondu par la négative et a bien voulu nous honorer de quelques conseils, dont nous tenons à le remercier ici très vivement.

Etudes de Miquel sur les antiseptiques s'opposant à la fermentation ammoniacale

Enfin MIQUEL, dans son étude sur la fermentation ammoniacale, après avoir décrit les principaux bactériens urophages, s'est préoccupé de l'action des divers antiseptiques sur ces microorganismes. Mais MIQUEL, comme la plupart des chimistes précédents, n'a dirigé le sens de ses recherches que vers des conclusions utiles au clinicien : Il a déterminé les

doses minima de certains antiseptiques capables de s'opposer efficacement à la fermentation ammoniacale de l'urine. D'après ses expériences, le bichlorure de Hg, puis le nitrate d'Ag seraient les agents les plus énergiques. L'acide borique n'agirait qu'à des doses très élevées, mais est supporté facilement par les muqueuses des voies urinaires. L'acide phénique est entièrement à rejeter pour cet usage, puisqu'il n'enrayerait sûrement la fermentation que dans des proportions voisines de 1 pour 66. MIQUEL préconise pour les malades atteints d'ammoniurie les lavages de sublimé à 1 pour 100.000 qui, d'après ses expériences, détruiraient à coup sûr l'uréase et feraient cesser promptement l'alcalinité des urines, l'acide borique serait utilisé ensuite pour compléter la guérison.



Tels sont les principaux travaux qui, dans des buts différents, ont été effectués en vue d'empêcher la fermentation ammoniacale de l'urine.

Le problème était intéressant à résoudre au point de vue clinique, et nombreux ont été les chimistes qui, depuis PASTEUR, ont essayé de réaliser, *in vivo*, les expériences de laboratoire afin de combattre l'ammoniurie des urinaires.

Le nitrate d'argent, l'acide borique, qui semblent avoir donné les meilleurs résultats au cours des recherches destinées à renseigner les cliniciens, ne peuvent être utilisés pour l'analyse.

Le travail de HUGUET, par contre, reste en entier. Mais si les sels de Hg, et plus spécialement le cyanure, ont été indiqués par la plupart des chimistes urologues, le choix de l'un d'entre eux n'a pas été nettement établi, et son usage définitivement adopté. Nous verrons, au contraire, au cours de l'exposé qui va suivre, que chaque auteur préconise un ou

plusieurs antiseptiques différents. Nous trouverons contre le plus grand nombre d'entre eux des arguments suffisants qui nous permettront de simplifier *a priori* notre travail et d'arriver ainsi, dans une certaine mesure, à une véritable sélection.

Ce premier choix ainsi établi, nous tâcherons de mettre au point l'action de chacun d'entre eux, vis-à-vis des réactifs généralement employés dans l'analyse urinaire ; nous signalerons les ennuis et inconvénients rencontrés au cours de ces recherches, nous essayerons ensuite de juger comparativement leur pouvoir antiseptique dans des conditions déterminées ; nous nous livrerons enfin à quelques essais personnels ; nous dégagerons une conclusion de l'ensemble des résultats obtenus, et le but que nous nous proposons sera atteint si nous pouvons indiquer, à la fin de notre travail, le meilleur procédé de conservation des urines en vue de l'analyse chimique et de l'examen histologique.

INCONVÉNIENTS ET SÉLECTION DES AGENTS CONSERVATEURS DE L'URINE EN VUE DE L'ANALYSE

Non seulement un grand nombre de substances ont été préconisées pour conserver les urines en vue de l'analyse, mais encore divers procédés ont été décrits dans le même but.

Moyens physiques

C'est ainsi que P. MAYER (1) conseille de conserver l'urine dans un flacon bouché, entouré de glace. Il recommande ce procédé même pour l'analyse bactériologique. Ce serait, en

(1) P. Mayer. — In *der Harn...* C. Neuberg, t. I, p. 41. Berlin. 1911.

effet, un moyen excellent, d'ailleurs employé pour l'analyse bactériologique de l'eau. Mais il ne peut être utilisé dans la pratique courante et ne mérite d'être signalé que comme expérience de laboratoire.

Complètement inutilisable, par contre, la conservation obtenue par une stérilisation à 120°, ainsi que l'ont indiqué successivement HUGOUNENQ (1) et BARRAL (2). Il faut disposer d'un autoclave, et pour ne citer que les principaux inconvénients qui se présentent à l'esprit, la coagulation des matières protéiques, la précipitation des phosphates, sans parler de la destruction de certains éléments figurés et la perte de substances volatiles, comme l'acétone, nous font rejeter définitivement cette méthode.

On ne voit guère la possibilité de s'adresser à un moyen physique pour obtenir une bonne conservation de l'urine, et il a bien fallu s'adresser aux diverses substances chimiques connues pour leurs propriétés antifermentescibles.

Antiseptiques chimiques inutilisables

Alex. MÜLLER, ainsi que nous l'avons vu, en a étudié le plus grand nombre. Mais la plupart des substances indiquées par ce chimiste sont inutilisables, leur addition dans l'urine faussant en grande partie les résultats analytiques.

Le chlorure de chaux, le sulfate de cuivre, le nitrate de plomb, le sulfure de carbone sont de ce nombre.

Quant aux corps de la série aromatique, comme l'acide

(1) Hugounenq. — *Chimie physiologique*, p. 435. 1897.

(2) Barral. — *Précis d'analyse biologique, pathologique et chimique*, p. 23. 1909.

salicylique, les naphthols, ils sont trop peu solubles et n'agissent qu'avec des doses trop élevées (HUGUET).

Le **phénol**, cependant, est quelquefois employé ; DENIGÈS (1) même en préconise l'emploi. Plusieurs chimistes, et dès les premiers travaux sur la fermentation ammoniacale, ont indiqué son peu d'action sur la vie du microorganisme de l'urée. MÜLLER indique bien comme dose suffisante à une bonne conservation un gramme de phénol par litre, mais MIQUEL (2), à la suite d'expériences plus récentes et très serrées, écrit : « L'acide phénique n'arrête toujours pas à 1 : 100 la fermentation des urines par l'urobacille, et se montre aussi mauvais antiseptique pour l'espèce organisée que pour la diastase qu'elle sécrète. »

HUGUET, enfin, a signalé l'action des dérivés de la série aromatique sur quelques-uns des réactifs habituellement employés dans les analyses urologiques et notamment le chlorure ferrique.

Pour toutes ces raisons, et surtout à cause de son pouvoir antiseptique douteux, l'acide phénique ne saurait être conseillé, ni adopté comme agent de conservation.

Le chlorhydrate de quinoléine (3), le sélénite de Na (4) en solution concentrée ont été tour à tour indiqués. Ces deux produits chimiques ne sont pas d'un usage courant et ne sauraient nous intéresser de ce fait.

NICOLAÏER (5) a préconisé l'urotropine. Encore que ce corps

(1) Denigès. — *Précis de chimie analytique*, p. 1126. 1913.

(2) Miquel. — *Loc. cit.*, p. 72.

(3) Donath. — *Bericht d. chem. Gesellsch.*, t. XIV, p. 184. 1881.

(4) Grapeck u. Weil. — *Arch. f. experi. Pathol.*, t. XXXII, p. 448. 1893.

(5) Nicolaïer. — *Deutsch. Medic. Wochenschrift*, t. XXI, p. 541. 1895.

ne paraît être antiseptique qu'à haute dose : on ne peut songer à l'utiliser, car sa présence dans l'urine ne nous permettrait plus de déterminer avec quelque valeur l'acidité libérée par le formol.

Quant aux fluorures de sodium ou d'ammonium indiqués par quelques auteurs (1), HUGUET les a déjà rejetés comme venant s'ajouter à l'acidité propre de l'urine.

Le **chloroforme** a été conseillé par plusieurs chimistes, et ce liquide est souvent employé à la dose de 5 à 10 cm³. par litre d'urine. C'est du moins dans ces proportions que le *Formulaire des Hôpitaux militaires* (2) en préconise l'usage. C'est un antiseptique d'une efficacité insuffisante, ainsi que l'ont démontré HUGUET et MIQUEL. Ce dernier a signalé plus spécialement que, même ajouté en excès, il n'exerce pas d'action appréciable sur l'uréase. Mais il devient surtout un moyen détestable de conservation par ses produits de décomposition très nombreux qui affectent les principaux réactifs ; il réduit, de plus, la liqueur de FEHLING (HUGUET).

Ces principaux inconvénients ont fait spécifier à S.-W. COLE (3) que, dans aucun cas, on ne devait employer le chloroforme. D'après cet auteur, le chloroforme soumis à l'ébullition en solution alcaline donne de l'acide formique qui agirait comme réducteur.

Nous ne pouvons, avec LABAT, que répéter la même sentence vis-à-vis de la solution d'**aldéhyde formique** indiquée par de nombreux urologues, et plus spécialement recommandée par

(1) Arthus et A. Huber. — *Arch. de Physiol. norm. et path.*, t. XXIV, p. 655. 1892.

(2) *Formulaire pharmaceutique des hôpitaux militaires*, t. II, p. 153.

(3) S.-W. Cole. — *Practical physiolog. chemistry*, p. 171. 1913.

LETIENNE et J. MASSELIN (1). VILLE et DERRIEN (2) ont déjà appelé l'attention, en effet, sur la transformation de l'urée, des acides aminés et des sels ammoniacaux qu'entraîne la présence du formol dans l'urine.

Antiseptiques sélectionnés

Le **camphre**, cher à RASPAIL, a recueilli aussi de nombreux suffrages. A. MÜLLER l'a signalé, BARRAL, RONCHÈSE (3), VILLE et DERRIEN l'indiquent dans leur Précis d'analyse. Nous n'avons pas trouvé d'inconvénients formulés contre lui. Le camphre étant d'un usage courant, ce procédé séduit par sa simplicité ; aussi proposons-nous d'établir son pouvoir de conservation, et, s'il nous donne satisfaction, d'étudier son action sur les divers réactifs de l'analyse.

Les sels de mercure. — HUGUET, dans sa note au Journal de Pharmacie et de Chimie sur la conservation des urines, conseille indifféremment : l'iodure, le chlorure ou le cyanure mercurique. Les deux premiers sels ont été éliminés par YVON et MICHEL (4), qui ont montré qu'ils précipitaient l'albumine. De plus, HUGOUNENQ reproche au biiodure d'agir et par l'iode et par le mercure sur les sels d'argent, et de gêner considérablement, de ce fait, le dosage de l'acide urique par la méthode de DENIGÈS. La présence de chlorure de sodium,

(1) A. Letienne et J. Masselin. — *Précis d'urologie clinique*, p. 30. 1904.

(2) Ville et Derrien. — *Chimie biologique médicale*, p. 215. 1914.

(3) Ronchèse. — *Guide pratique des analyses d'urine*, p. 3. 1912.

(4) Yvon et Michel. — *Manuel d'analyses d'urine et de sémiologie urinaire*, p. 56, 7^e édit.

afin d'augmenter la solubilité du sublimé, demande également une correction très faible, il est vrai, dans le dosage des chlorures. Enfin, les sels de Hg, en général sont une cause d'erreur dans la détermination de l'azote total par la méthode de KJELDHAL.

Si la grande majorité des divers auteurs de traités d'analyses n'ont pas opté pour le biiodure et le sublimé corrosif, le **cyanure de mercure**, par contre, a reçu un meilleur accueil. Il est généralement préconisé sous la forme prescrite par HUGUET : 2 cm³. d'une solution à 10 % dans un bocal destiné à recueillir les urines de 24 heures. C'est ce procédé qui est employé dans les salles de l'Hôpital suburbain où l'urine est conservée à l'aide de 5 cm³. d'une solution de cyanure de Hg à 5 %. La dose d'antiseptique est donc ici plus élevée. Le Formulaire des Hôpitaux militaires n'utilise que 5 cm³. d'une solution à 1:50 pour la conservation des émissions de 24 heures, mais avec addition du même antiseptique dans le flacon destiné à recevoir l'échantillon moyen : ce qui correspond finalement à la quantité déterminée par HUGUET. DENIGÈS indique une dose égale à 0 gr. 10 par litre d'urine. Certains auteurs sont moins précis et préconisent l'emploi de quelques cristaux.

Les reproches adressés aux sels de mercure précédents, sauf cependant la précipitation de l'albumine, subsistent pour le cyanure.

HUGOUNENQ (1) fait remarquer, en outre, que le cyanure mercurique « réduit un peu la liqueur de FEHLING ».

Le **thymol**. — De tous les antiseptiques employés dans la pratique courante, la première place revient certainement au thymol.

Conseillé par la plupart des chimistes urologues, quelquefois en solution alcoolique (MÜLLER) ou chloroformique

(1) Hugounenq. — *Loc. cit.*, p. 435.

(O. FOLIN) (1), le thymol a été indiqué par certains comme le meilleur antiseptique à conseiller pour la conservation de l'urine. C'est au moins l'avis de LABAT, qui fait introduire dans le bocal destiné à recueillir l'urine des 24 heures un cristal de thymol gros comme un pois, en recommandant de ne pas employer cet antiseptique en poudre ou en menus fragments, lesquels seraient très difficiles à séparer ultérieurement et gêneraient considérablement l'opérateur pour procéder à l'examen microscopique du sédiment.

L'emploi du thymol implique quelques inconvénients déjà signalés :

DENIGÈS (2) a montré que le dosage de l'acétone urinaire par distillation et emploi de l'iode ne peut être tenté en présence du thymol. Ce phénol passe, en effet, dans le distillat et, en milieu alcalin, s'empare d'une certaine quantité d'iode pour donner du thymol-biiodé. DENIGÈS indique, il est vrai, le moyen de s'en débarrasser, mais le procédé est long et demande une double distillation. Il conseille d'employer, dans ce cas, le dosage chronométrique avec le sulfate acide de mercure.

VILLE et DERRIEN (3) signalent une cause d'erreur qui peut se produire avec les urines conservées au thymol, dans la recherche de l'albumine par la réaction de HELLER. Mais alors que l'albumine donne un anneau blanchâtre reposant directement sur l'acide azotique, la présence du thymol dans l'urine est indiquée par une zone nébuleuse se formant au-dessous de l'anneau rougeâtre qui apparaît habituellement au contact des deux liquides.

(1) O. Folin. — *Handbuch d. Biochemisch. arbeit. method.*, t. V, p. 282.

(2) Denigès. — *Loc. cit.*, p. 1194.

(3) Ville et Derrien. — *Loc. cit.*, p. 307.

En mélangeant l'urine à l'acide et en agitant doucement avec l'éther, le liquide devient limpide s'il n'y a pas d'albumine.

BECHHOLD (1) a prétendu que, tout comme les sels de mercure, le thymol retardait l'apparition du précipité noir caractéristique dans la réaction de NYLANDER. Enfin, un pharmacien de la marine, AUCHÉ (2), a pu constater que l'urobiline est déplacée par le thymol, et, au bout d'un temps plus ou moins long, le cristal est entièrement recouvert par l'urobiline.

Le **toluène**. — Les chimistes allemands et anglais accordent au toluène des préférences marquées comme moyen de conservation de l'urine. Très employé à l'étranger à la dose de cinquante gouttes environ par litre, cet antiseptique est peu utilisé en France. Nous n'avons pu retrouver contre lui la moindre objection. Nous nous proposons donc de le comprendre dans la série de nos recherches.

CONSERVATION EN VUE DE L'EXAMEN MICROSCOPIQUE

Certaines substances ont été plus spécialement préconisées pour la conservation des éléments figurés en vue de l'examen histologique.

Nous ne pensons pas cependant qu'il y ait lieu d'admettre deux agents conservateurs ; l'un en vue de l'analyse chimique, l'autre pour l'examen du sédiment. Les deux analyses, se complétant en effet l'une l'autre, et s'effectuant toujours dans la pratique courante sur la même urine, l'antiseptique de choix doit donc réunir les deux qualités : assurer la bonne

(1) Bechhold. — *Zeitschr. physiol. Chemie*, t. XLVI, p: 371. 1905.

(2) Auché. — Sur une nouvelle méthode pour rechercher et séparer l'urobiline et son chromogène (*Soc. Biolog.*, p. 713, déc. 1907).

conservation et des constituants chimiques et des éléments histologiques.

Dans le but de mettre l'urine à l'abri des poussières de l'air dans la sédimentation par dépôt, certains auteurs ont signalé l'emploi du toluène, des huiles essentielles qui viennent former une nappe liquide au-dessus de l'urine.

On a conseillé également l'emploi de liquides spéciaux, comme celui de MÜLLER, dont voici la formule :

Sulfate de sodium.....	-10 gr.
Bichromate de potassium....	30 —
Eau distillée.....	1000 —

ou celui de HAYEM utilisé pour la fixation du sang :

Bichlorure de mercure.....	0 gr. 50
Sulfate de soude.....	5 —
Chlorure de sodium.....	1 —
Eau distillée.....	200 —

D'après les deux ouvrages classiques en matière de microscopie urinaire, l'Atlas du Dr HERMANN RIEDER (1) et la « microscopie clinique » de M. DEGUY et A. GUILLAUMIN (2), l'addition de formol dans les proportions de 0,5 o/o serait le meilleur procédé de conservation des éléments figurés, et aussi de l'urine en général.

Nous avons déjà signalé, d'après VILLE et DERRIEN, l'action de l'aldéhyde formique sur les constituants normaux de l'urine, mais les mêmes auteurs ont constaté également que la présence de cet antiseptique peut être une cause d'erreur dans l'examen microscopique du sédiment.

(1) Dr H. Rieder. — *Atlas de microscop. cliniq. de l'urine*. Traduction du Dr L. Dekeyser, p. 3. 1903.

(2) M. Deguy et A. Guillaumin. — *Microscopie clinique*, p. 304. 1906.

Le formol provoque en effet la formation de méthylène-urée, qui affecte la forme de corps globuleux, pouvant être confondus avec les corpuscules de leucine. Ils présentent d'ailleurs, comme ces derniers, le phénomène de la croix de polarisation. On peut les distinguer cependant de la leucine par leur insolubilité dans les acides dilués et par les réactions du formol (1).

A la suite d'un travail de E. DÉBAINS (2), il est coutume d'utiliser dans les laboratoires, dans le but de conserver les éléments histologiques, l'essence de moutarde. L'auteur a pu, grâce à ce procédé, conserver pendant deux ans des urines albumineuses purulentes sans aucune altération. Il se sert d'une solution alcoolique au 1/5° d'essence de moutarde. X gouttes par litre suffisent pour une analyse chimique et histologique, 1 goutte pour 10 cm³. dans les cas d'une analyse bactériologique.

DÉBAINS, en effet, utilise ce procédé de conservation avec succès pour les recherches bactériologiques et notamment pour le diagnostic de la tuberculose urinaire.

Pour notre part, nous avons délaissé volontairement la partie bactériologique de l'analyse. Il ne peut être question ici de conserver l'urine au moyen d'un antiseptique. Il faut bien admettre, en effet, que pour obtenir un résultat positif certain, l'examen microscopique doit être effectué sur une urine recueillie dans des conditions aseptiques, réalisées par le médecin seul, le plus souvent par cathétérisme des uretères et soumise à la centrifugation dans le plus bref délai possible.

(1) Ville et Derrien. — La méthylène-urée cause d'erreurs en microscopie urinaire (*Bulletin Soc. chimiq. de France*, p. 791. 1912).

(2) E. Debains. — *Annal. malad. des organes génito-urinaires*, t. XXIII, p. 1663. 1905.

L'examen direct ne permet toujours pas de déceler de bacilles de KOCH, dans la tuberculose urinaire par exemple; il devient alors indispensable, afin d'éclairer définitivement le diagnostic du chirurgien, de faire une inoculation au cobaye. Ce moyen de contrôle *obligatoire* n'est plus possible si l'urine renferme un antiseptique.

**

De l'exposé qui précède, il résulte qu'un certain nombre d'antiseptiques proposés et même couramment employés sont *a priori* rejetés définitivement. Nous avons pu dresser contre eux, à l'aide d'inconvénients déjà décrits, un réquisitoire suffisant pour les faire condamner :

Trois cependant méritent d'être étudiés de plus près, pour la conservation d'une urine destinée à la fois à l'analyse chimique et à l'examen histologique. Nous avons donc été amené à faire une véritable sélection, et c'est, en fin de compte, sur le *cyanure de mercure*, en raison de sa valeur reconnue, sur le *thymol*, d'un emploi si fréquent, et sur le *toluène*, utilisé surtout à l'étranger, que nous allons diriger nos recherches.

Nous joindrons à ces trois substances, dont le choix s'imposait, les essais du *camphre*, qui présenterait les avantages d'un moyen très simple et tout à fait pratique.

Nous essayerons également diverses huiles essentielles : l'*essence de moutarde* en solution alcoolique au 1/5°, préconisée par DEBAINS, l'*essence de menthe poivrée*, qui a été déjà signalée (RIEDER), et, enfin, le principe actif de l'essence d'eucalyptus : l'*eucalyptol*, dont les propriétés antiseptiques sont bien connues, mais n'ont jamais été utilisées pour la conservation de l'urine.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES ANTISEPTIQUES SÉLECTIONNÉS

I. LES ANTISEPTIQUES ET L'ANALYSE CHIMIQUE

Dans une première série d'analyses, nous nous sommes préoccupé d'étudier l'action du cyanure mercurique, du thymol et du toluène vis-à-vis des réactifs généraux de l'analyse urinaire.

Nous nous sommes livré tout d'abord à quelques essais préliminaires, en vue de déterminer certaines propriétés physiques et les caractères organoleptiques de l'urine, qui peuvent être modifiés du fait de l'addition d'une substance antiseptique; puis, nous avons établi la composition de l'urine témoin, en nous attachant à déterminer les principaux constituants normaux réguliers (1) qui sont demandés au chimiste dans la pratique courante, et qui lui permettent de calculer les rapports urologiques usuels.

Nous avons négligé certaines données de l'analyse qui ne peuvent être modifiées par la présence d'une quantité si minime d'antiseptique, comme l'extrait sec par exemple, ou qui ne sont guère que des expériences de laboratoire, comme la détermination du point de congélation.

(1) Nous avons adopté la classification proposée par Maillard, qui distingue les constituants normaux en réguliers et irréguliers. (Maillard, *Journal de physiologie et pathologie générale*, t. XII, p. 345. 1910.)

Nous avons étudié ensuite l'action de ces mêmes antiseptiques sur les réactifs capables de décélérer la présence en excès notable des constituants normaux irréguliers de l'urine.

Nous avons, enfin, dirigé des recherches parallèles sur les constituants anormaux qui peuvent se rencontrer dans l'urine de certains malades.

Nos méthodes de recherches et de dosage sont celles indiquées par les ouvrages les plus récents et sont généralement employées dans les laboratoires modernes.

Afin d'obtenir des résultats comparables, nous nous sommes toujours servi des mêmes réactifs que ceux vérifiés soigneusement avant chaque analyse témoin, et nous nous sommes appliqué à faire usage des mêmes pipettes et des mêmes burettes pour les dosages sur les urines conservées et sur les urines témoins.

Enfin, voici, pour nous résumer, l'ordre suivi au cours de nos diverses recherches :

ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Aspect.

Odeur.

Densité à $+ 15^{\circ}$.

Réaction au tournesol.

CONSTITUANTS NORMAUX

a) *Réguliers.*

Acidité apparente à la phénolphthaléine exprimée en cm^3 de soude N/10.

Acidité libérée par le formol,

exprimée en $\begin{cases} \text{cm}^3 \text{ de soude N/10 ;} \\ \text{— N (azote formol) ;} \\ \text{— NH}^3 \text{ (en urée).} \end{cases}$

Urée < Indice hypobromique déféqué.
Urée RONCHÈSE.

Acide urique.

Créatinine.

Azote total.

Chlorures en NaCl.

Phosphates en P^2O^5 .

Acétone.

b) *Irréguliers.*

Indoxyle.

Urobiline.

CONSTITUANTS ANORMAUX

Albumines.

Sucres.

Acétone.

Sang.

Bile.

A. **Essais préliminaires et méthodes employées pour la détermination des constituants normaux réguliers.**

Pour étudier l'action des antiseptiques sélectionnés sur les caractères généraux de l'urine et sur les méthodes habituelles d'analyse, nous avons recueilli dans des récipients en verre, soigneusement lavés à l'eau distillée bouillante, puis égouttés, une certaine quantité d'urine émise extemporanément par plusieurs personnes en bonne santé. Nous avons pu ainsi obtenir une urine mixte d'une densité voisine de 1020, de couleur jaune ambrée et présentant à l'analyse les caractères physiques et chimiques de l'urine normale conventionnelle.

Cette urine mixte, recueillie le 5 décembre, a été divisée en 4 flacons de 250 cm³. Nous avons introduit au préalable dans le flacon n° 1 : *0 gr. 05 de cyanure de mercure* (solution de HUGUET); dans le n° 2 : *un cristal de thymol*; dans le n° 3 : *XV gouttes de toluène*. Ces trois flacons, hermétiquement bouchés, ont été apportés dans une salle non chauffée et dont la température n'a pas dépassé + 6°.

Le contenu du quatrième flacon nous a permis d'établir les diverses données de l'urine témoin :

Aspect. — Urine limpide de couleur jaune ambrée.

Odeur. — *Sui generis* : légèrement aromatique.

Densité à + 15°.

La détermination de la densité présente, en dehors de sa signification propre, un intérêt tout particulier : Elle nous renseigne, en effet, d'une façon très suffisante pour les besoins de la clinique, sur la valeur de l'extrait sec à 100°. Il suffit de multiplier par 2 les deux derniers chiffres de la densité à 15°, pour connaître la teneur en extrait sec de l'urine. Pour si approximative que paraisse cette méthode, « elle peut être considérée comme exacte ». (LABAT).

La densité de notre urine témoin ramenée à 15° étant de 1020 et l'extrait calculé (20×2) étant de 40 gr., nous avons en effet obtenu un extrait sec à 100° de 40 gr. 15.

Réaction. — Acide au papier de tournesol.

Acidité dite apparente. — Cette acidité est susceptible de se modifier dans l'urine conservée : celle-ci pouvant être le siège de diverses fermentations, que nous étudierons plus longuement dans l'un des chapitres suivants.

Nous avons déterminé cette réaction à l'aide de phénol-phtaléine et l'avons exprimée en centimètres cubes de solution

de soude décinormale nécessaire à saturer l'acidité d'un litre d'urine.

Acidité libérée par le formol. — Nous insisterons plus spécialement sur cette acidité, établie selon la méthode de RONCHÈSE, lorsque nous voudrons apprécier le pouvoir antiseptique des divers agents de conservation de l'urine qui sont l'objet de nos essais.

Cette acidité, qui est obtenue en libérant à l'aide du formol les acides combinés à l'ammoniaque urinaire et l'acidité des acides aminés, est exprimée en centimètres cubes de soude N/10, mais peut aussi être exprimée en azote (azote-formol), et vient ainsi constituer le numérateur du rapport de MAILLARD.

Urée. — Le dosage de l'urée par l'hypobromite de soude a été adopté par l'un des derniers Congrès de chimie appliquée (section IX) comme étant une méthode clinique suffisamment précise.

Nous avons donc eu recours dans nos expériences au dosage gazométrique corrigé par le procédé de RONCHÈSE. Cet auteur a montré, en effet, que l'ammoniaque et l'acide urique dégagent, sous l'action de l'hypobromite, la plus grande partie de l'azote non uréique.

En déféquant l'urine à l'aide d'une solution de sous-acétate de plomb, on élimine l'acide urique. Par un dosage gazométrique opéré comparativement avec une solution titrée d'urée, on arrive ensuite à établir l'indice hypobromique déféqué, qu'on peut exprimer en Urée ou en Azote. Cette dernière donnée constitue le dénominateur du rapport de MAILLARD, sous la forme clinique proposée par DERRIEN.

Connaissant, grâce à l'acidité libérée par le formol, la valeur de l'ammoniaque, et en retranchant celle-ci, après

l'avoir exprimée en urée, de l'indice hypobromique déféqué, on obtient l'urée RONCHÈSE. C'est l'azote de ce constituant ainsi établi qui est le numérateur *rapport azoturique*.

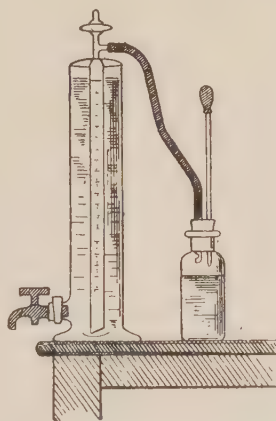
Nous tenons à décrire ici l'uréomètre qui nous a permis non seulement d'apprécier d'une façon très sensible tous nos dosages d'urée au cours de nos expériences, mais qui facilite notre tâche quotidienne au laboratoire des Cliniques de l'Hôpital Suburbain. Nous l'indiquons avec d'autant plus de plaisir, que nous sommes sûr d'être utile à tous nos confrères qui font des analyses *en série* et qui ne disposent pas d'un appareil pratique.

Ce gazomètre est dû à M. le D^r MOITESSIER, professeur à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Marseille, qui a bien voulu nous confier le cliché représentant son appareil, ce qui en facilitera la description.

Il se compose d'un flacon de 100 centimètres cubes environ destiné à recevoir l'hypobromite de soude et relié par un tube en caoutchouc à une cloche à gaz en verre de 20 centimètres cubes graduée en dixième de centicubes.

Cette cloche à gaz, qui est échan-crée à sa partie inférieure, plonge dans une éprouvette munie d'un robinet et remplie d'eau.

Mais alors que dans la plupart des nombreux uréomètres à eau la cloche à gaz est simplement reliée au flacon générateur, celle construite par le D^r MOITESSIER possède à son extré-mité supérieure une ouverture d'échappement commandée par un robinet. Grâce à cet heureux dispositif, l'appareil est très rapidement mis en état de fonctionner. Le robi-



net de la cloche étant ouvert, il suffit d'enlever ou d'ajouter de l'eau pour produire l'égalité de niveau du liquide et dans la cloche et dans l'éprouvette à une division connue : le 0 par exemple. Le bouchon du flacon destiné à recevoir l'hypobromite est percé de deux trous. L'un permet à l'azote dégagé de se rendre dans l'éprouvette, l'autre est destiné à recevoir une pipette de 2 cm³ exactement divisée et fermée hermétiquement à sa partie supérieure par une petite poire de caoutchouc.

Le dosage s'effectue rapidement : On mesure très soigneusement un centimètre cube d'urine par une légère aspiration de la poire, et l'on enfonce la pipette de façon à obturer complètement le trou du bouchon. Après s'être assuré que l'extrémité de la pipette se trouve nettement au-dessus de l'hypobromite, on ferme le robinet de la cloche, puis, en pressant sur la poire, on projette l'urine dans le réactif. Le flacon est agité doucement, en ayant soin de ne pas échauffer le contenu avec la main. Après avoir fait coïncider, grâce au robinet de vidange de l'éprouvette, les niveaux d'eau à l'extérieur et à l'intérieur de la cloche, on peut lire alors directement le nombre de divisions correspondant au dégagement gazeux.

L'usage de la pipette est surtout très pratique pour opérer des dosages d'urée en série. Pour des dosages plus précis et notamment pour les azotémies, il est préférable de placer l'urine ou le défécat de Moog dans un petit récipient en verre. Ce dernier est introduit à son tour dans le flacon renfermant l'hypobromite après s'être assuré que ses bords émergent au-dessus du liquide. Avec ce dispositif, le bouchon de caoutchouc ne possède plus qu'une seule ouverture reliée à la cloche à gaz.

On opère comme précédemment : l'appareil étant réglé, il

suffit de provoquer le mélange des deux liquides en renversant plusieurs fois le flacon générateur pour produire la réaction et lire ensuite le dégagement gazeux.

Acide urique et corps puriques urinaires. — Le dosage en bloc des corps xantho-uriques présente l'avantage, au point de vue clinique, de fournir un renseignement complet sur la valeur globale de ces composés azotés de l'urine.

Pour effectuer ce dosage, on a recours, dans les laboratoires, au procédé HAYCRAFT-DENIGÈS. C'est donc par cette méthode que nous avons dosé l'acide urique dans l'urine témoin, et que nous étudierons par la suite, comparativement sur les urines conservées, l'action du cyanure de mercure, du thymol et du toluène.

Créatinine.—Nous étudierons l'action de ces mêmes antiseptiques sur le procédé de dosage de la créatinine par la méthode colorimétrique de FOLIN, à l'aide de l'appareil de DUBOSQ.

Azote total. — Pour les dosages comparatifs de ce constituant normal, nous nous sommes adressé au procédé de KJELDHAL, suivant la technique de DENIGÈS, et en dosant l'ammoniaque du sulfate d'ammonium ainsi obtenu par la méthode de RONCHÈSE.

Chlorures exprimés en NaCl. — Le haut intérêt clinique que présente l'étude de l'élimination chlorurée a suscité un certain nombre de méthodes de dosage qui peuvent se diviser en quatre groupes :

- 1° Méthodes pondérales ;
- 2° Méthodes indirectes (CHARPENTIER, DENIGÈS) ;
- 3° Méthodes directes après élimination des substances organiques (MOHR, DENIGÈS, LOUBIOU) ;
- 4° Méthode directe sans élimination des substances organiques (avec correction d'après VILLE et DERRIEN).

Les méthodes pondérales restent très précises, mais ne peuvent être modifiées du fait d'un antiseptique.

Les méthodes indirectes de CHARPENTIER (modifié par VOLHARD) et de DENIGÈS sont considérées à juste titre comme très exactes, mais sont longues et délicates. Aussi, dans la pratique courante de l'analyse urinaire, préfère-t-on s'adresser aux méthodes directes. VILLE et DERRIEN ont montré qu'à l'aide d'une correction établie en fonction de la densité, il n'y avait pas lieu de détruire la matière organique, opération qui doit toujours être conduite avec grand soin, et que les résultats obtenus par ce procédé direct approchent sensiblement ceux fournis par les méthodes les plus précises.

VILLE et DERRIEN dosent les chlorures urinaires à l'aide d'une solution d'azotate d'argent à 29 gr. 07 pour 1.000 en présence de chromate de potassium (V gouttes d'une solution au 10^e). Lorsque l'urine a une densité supérieure à 1010, la quantité de chlorure de Na par litre ainsi obtenue et qui correspond au nombre de centimètres cubes de la solution argentique employée, doit subir une correction. Celle-ci est donnée par la différence que présente l'urine vis-à-vis de cette densité type de 1010 et en multipliant cette différence par le coefficient 0,07.

Nous avons utilisé ce procédé pour faire nos essais comparatifs, mais en nous adressant à une solution d'azotate d'argent d'un autre titre.

A la dose de 29 gr. 07 par litre, le nitrate d'argent donne une solution susceptible de s'altérer à la longue : de plus, le virage fourni par cette solution concentrée (dont chaque dixième de centimètres cubes, en opérant sur 10 centimètres cubes, précipite une quantité de chlore correspondant à 0 gr. 10 de NaCl par litre) apparaît trop brusquement et ne permet pas d'apprécier avec une précision suffisante le terme de la

réaction. La solution N/10 de nitrate d'argent nécessitant un calcul, nous avons préféré adopter la solution utilisée en hydrologie et renfermant 14 gr. 535 AzO^3Ag pour 0/00 ($1\text{ cm}^3 = 0,05$ centigrammes de NaCl). En opérant sur 5 centimètres cubes d'urine, on a, par simple lecture, la teneur en grammes et par litre de chlorures exprimés en NaCl . Le virage obtenu à l'aide de cette solution est moins brusque, et ce procédé permet de réaliser de plus une économie de réactif.

Phosphates exprimés en P^2O^5 . — Le procédé volumétrique de LECOMTE est généralement adopté pour effectuer ce dosage. Il est basé sur la précipitation à l'état de phosphate d'uranyle, des phosphates dissous dans un liquide acidulé par l'acide acétique. Nous y avons eu recours pour vérifier l'action des antiseptiques sélectionnés, en nous servant des réactions indicatrices colorées fournies par la teinture de cochenille et le ferrocyanure de potassium. Nous avons pu observer au cours de nos expériences que la solution de ferrocyanure faite au moment du besoin est beaucoup plus sensible qu'une solution déjà ancienne.

Acétone. — L'acétone existe à l'état de traces dans l'urine normale. C'est donc un constituant régulier. Il peut être décélé par plusieurs réactions : une des meilleures et des plus sensibles est certainement celle de FROMMER-EMILEWICZ. Ce réactif nous permet, en effet, d'apprécier, dans l'urine même, si la quantité d'acétone qui s'y trouve est normale ou non.

Lorsqu'à 5 cm^3 d'urine environ on ajoute V gouttes d'une solution alcoolique d'aldéhyde salicylique au 10° et 2 pastilles de potasse caustique et que l'on chauffe très doucement vers 70° : Il se développe à la zone de séparation de la couche inférieure alcaline un anneau jaune orangé plus ou moins intense : L'acétone existe alors à l'état de traces normales. Dès que cet anneau, dû à la formation de dioxydibenzalacétone,

Aspect. — Sans modifications apparentes : un motif floconneux blanc apparaît dans chaque flacon. L'urine conservée au thymol est cependant légèrement louche.

Odeur. — L'urine conservée au cyanure de mercure présente une odeur assez prononcée. Elle est peut-être plus aromatique ; on sait, en effet, que les sels de mercure ont une grande affinité pour les méthaplantés (mercurium caplant). C'est que ces métaux attaquent l'urine, comme le méthylmercure, par exemple, CH_3Hg , donnant une combinaison mercurique de l'urine, $\text{C}_10\text{H}_8\text{Hg}$ et dégageant ainsi l'odeur spéciale de ces corps, perceptible à des doses extraordinairesment faibles. Cette expérience est facile à vérifier sur les urines et sur des acides organiques d'aperges. De telles urines ainsi que l'a montré L. Nencki (1), doivent leur odeur spéciale à des méthylmercurures, qui disparaissent très rapidement après addition d'une petite quantité de cyanure de mercure.

Le formol et le thymol ont communiqué respectivement à l'urine leur odeur propre, qui vient complètement masquer celle du liquide conservé.

Densité et Réaction. — Pas de modifications apparentes par la présence des agents de conservation.

Acidité apparente à la phénolphthaléine et Acidité libérée par le formol. — Dans les conditions de leur emploi, les trois conservateurs considérés ci-dessus ne paraissent pas modifier les acidités acidimétriques urinaires.

Crée. — Le cyanure de Hg, le thymol et le toluène sont sans action sur l'hypobromite de soude, tout au moins aux doses utilisées pour la conservation de l'urine.

1. L. Nencki. — *Archiv. fur Expt. pathol.*, t. XXVIII, p. 286.

Acide urique. — Le thymol et le toluène sont parfaitement compatibles avec l'emploi du procédé HAYCRAFT-DENIGÈS. La quantité d'acide urique retrouvée correspond exactement à celle obtenue au premier dosage. Il est cependant de toute nécessité, pour obtenir des résultats comparables, de se placer dans les mêmes conditions de lumière. Nous avons trouvé, au début de nos premières expériences, des écarts parfois assez importants, qui provenaient du temps plus ou moins long qui s'était écoulé entre le mélange de la solution ammoniaco-magnésienne argentique et le dosage final. Les mêmes opérations effectuées dans la chambre noire donnent des résultats identiques. Il est absolument obligatoire, lorsque, pour une raison quelconque, on doit interrompre les opérations de ce dosage, de placer le mélange sensible à l'abri de la lumière.

Si le thymol et le toluène sont sans effet sur les réactifs employés dans le procédé HAYCRAFT-DENIGÈS, il n'en est pas de même pour le cyanure de mercure, qui présente le gros inconvénient de s'opposer à la perception nette du trouble opalescent dû à la formation d'iodure d'argent, indiquant le terme du dosage.

Dès l'addition de la solution ammoniaco-magnésienne demi-décinormale de nitrate d'argent à l'urine cyanurée, le mélange prend un aspect grisâtre. Le liquide ainsi obtenu, versé sur un filtre, y laisse déposer un précipité qui brunit rapidement.

Le liquide filtré présente, à son tour, un reflet métallique opalescent dont on ne peut se débarrasser même après plusieurs filtrations, et qui vient gêner considérablement l'observation de la réaction finale. On est obligé d'ajouter un excès notable d'azotate d'argent N/10 pour que le virage soit nettement perceptible. L'erreur ainsi produite pour des urines renfermant 2 centigrammes de cyanure mercurique pour 100,

nous a donné un chiffre moyen de 0 gr. 07 d'acide urique supérieur à celui de l'urine témoin.

Nous avons cherché à préciser la nature de ce précipité colloïdal qui passe obstinément à travers le filtre.

Après plusieurs hypothèses, nous sommes venu à admettre le fait suivant : Le cyanure de mercure, sous l'action oxydante du nitrate d'argent ammoniacal, voit sa molécule se disloquer. Le mercure libéré se combine au soufre neutre de l'urine pour donner une combinaison sulfomercurique.

Nous n'avons pu nous placer exactement dans des conditions identiques à celles fournies par l'urine même, afin de vérifier cette réaction : L'ensemble des composés sulfurés désignés sous la dénomination de soufre neutre est encore mal défini et se rattache vraisemblablement au groupe des acides oxyprotéïques. *La cystine*, qui existe très rarement dans l'urine, renferme dans sa molécule du soufre, qui paraît être voisin de la forme urinaire envisagée. C'est à l'aide de cette substance préparée par M. le Professeur DERRIEN que nous avons pu observer la formation de sulfure de mercure.

a) Lorsqu'à 100 cm³ d'une solution saturée d'urate de sodium dans l'eau distillée on ajoute deux centigrammes de cyanure de mercure (solution à 1 o/o) puis 25 cm³ de la solution ammoniaco-magnésienne et argentique de DENIGÈS (solution A) le liquide obtenu reste incolore pendant plusieurs heures.

b) En remplaçant, dans l'expérience ci-dessus, le cyanure de mercure par 0 gr. 10 de cystine soluble en milieu ammoniacal, on obtient également un liquide incolore.

c) Mais si, toujours dans les mêmes conditions, on met en présence cyanure et cystine, on observe, après plusieurs mi-

notes, la formation d'un précipité floconneux opalescent *qui brunit très lentement*. Cette réaction cependant est beaucoup plus lente que pour les urines conservées au cyanure mercurique.

d) 100 cm³ d'urine renfermant 0 gr. 02 de Cy²Hg, additionnés de 12 cm³ 5 de la solution ammoniacale et magnésienne seule, donnent un précipité qui reste, même après plusieurs heures, d'un blanc jaunâtre. Si on ajoute 12 cm³ 5 de la solution N/10 d'azotate d'argent on peut observer très rapidement le brunissement du mélange.

Cette dernière partie de l'expérience démontre bien l'action du nitrate d'argent ammoniacal, qui provoque l'oxydation du cyanure et favorise peut-être la combinaison du mercure au soufre.

Créatinine. — Les trois antiseptiques essayés sont sans influence sur la réaction de JAFFÉ. Même après une longue période de conservation, nous avons pu retrouver la même quantité de créatinine que pour l'urine témoin. Ce dosage, d'ailleurs, n'a de signification que pour les malades soumis à un régime sans créatinine.

Azote total. — HUGOUNENQ et GÉRARD ont reproché aux sels mercuriques en général de fausser quelque peu le dosage de l'azote total par la méthode de KJELDHAL. Nous avons effectué nos recherches à l'aide de ce procédé modifié si heureusement par DENIGÈS : nous n'avons pu constater la moindre erreur causée par la présence du cyanure de mercure, qui d'ailleurs, sur 10 centimètres cubes, ne figure qu'à l'état de 2 milligrammes. Les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes, autant que peuvent être comparables deux dosages successifs d'azote total. Le thymol et le toluène ont donné également des résultats satisfaisants.

Chlorures et Phosphates. — Les trois urines conservées nous ont donné les mêmes chiffres correspondants aux quantités respectives de l'urine témoin.

Acétone. — Dans la réaction de FROMMER-EMILEWICZ, le cyanure de mercure subit au contact de la potasse et en présence de l'aldéhyde salicylique, une libération de Hg, qui se traduit par une zone grisâtre. Mais cette réaction secondaire ne gêne en rien la perception de l'anneau rouge que produit l'acétone. Avec le thymol et le toluène, réaction normale.

C. Action des antiseptiques sur l'étude des constituants normaux irréguliers

Avec MAILLARD, nous donnerons le nom de constituants irréguliers aux constituants normaux de l'urine, dont les variations quantitatives ne dépendent pas du genre de vie et de l'alimentation de l'individu, mais de l'état et des modifications de sa flore intestinale.

INDOXYLE

Avec les urines conservées au thymol, ainsi que l'a déjà indiqué DENIGÈS, le chloroforme utilisé dans la recherche de l'indoxyle par le procédé de MAILLARD, prend une teinte lilas violacé. Cette coloration n'est pas due à la seule présence du thymol. Une solution d'urée conservée de longue date à l'aide de cet antiseptique ne produit pas, après avoir été traitée par l'acide chlorhydrique et par un oxydant, la coloration violette du chloroforme. Mais si, comme nous l'avons fait, on ajoute à cette même solution d'urée, une trace d'indoxylsulfate de potassium cristallisé et pur, on peut observer

l'apparition de cette coloration. On peut donc admettre que la réaction est due à une combinaison du thymol avec l'indoxyle.

La recherche de ce constituant n'est pas incompatible avec l'emploi du thymol : il suffit d'être prévenu du changement de coloration obtenu, mais pour des études plus complètes sur l'indoxyle, la conservation à l'aide de cette substance doit être évitée. Rien de particulier pour les urines conservées au cyanure de mercure et au toluène.

UROBILINE

L'urine normale présente à l'émission et à l'état de traces variables un chromogène : l'urobilinogène, qui, par oxydation, donne naissance à une série de pigments. Ces derniers pour les besoins de la clinique ont été compris sous le nom d'« urobiline ». Sous l'influence d'états pathologiques divers, — le plus souvent fébriles — on peut en rencontrer dans les urines un excès notable. La présence de l'urobiline est décelée par la propriété qu'elle possède en solution convenablement ammoniacale de donner une fluorescence verte plus ou moins intense en présence d'un sel de zinc.

Les procédés de recherche décrits par un certain nombre d'auteurs (OLIVERO, DENIGÈS, ROMAN et DELLUC, modifié par GRIMBERT) demandent plusieurs opérations successives (filtration, décantation) et nécessitent l'emploi d'appareils spéciaux. Beaucoup plus simple, mais fournissant cependant des indications certaines, est la technique suivante, jusqu'ici inédite, utilisée par le professeur E. DERRIEN au laboratoire de chimie de l'Hôpital Suburbain :

L'extraction de l'urobiline et sa réaction caractéristique se passent dans un simple tube à essais : on introduit dans ce dernier 15 cm³ environ d'urine. Pour être certain de la trans-

formation totale de l'urobilinogène en urobiline, on ajoute 1 goutte de teinture d'iode diluée au dixième et pour mettre en liberté l'urobiline de ses sels, 4 à 5 gouttes d'acide acétique cristallisable. Après avoir agité vivement ce premier mélange, on verse dans le tube environ 2 cm³ d'alcool amylique. On ferme avec le pouce et l'on renverse plusieurs fois le tube à essais sans dessus-dessous en évitant d'émulsionner trop fortement les deux liquides. Très rapidement l'alcool amylique vient surnager l'urine, et si cette dernière est riche en urobiline une première indication est fournie par la faible coloration acajou de l'alcool. (Certaines substances, et en particulier celles renfermant de l'acide chrysophanique, peuvent donner cependant une coloration voisine). L'urine, par contre, est décolorée en partie. Pour désémulsionner d'une façon plus parfaite le mélange, on ajoute une dizaine de gouttes d'alcool méthylique. Directement dans cette solution alcoolique on verse un léger excès de pyridine (10 à 15 gouttes) puis une pincée d'acétate de zinc pulvérisé. En examinant le tube sur un fond noir, ou mieux en faisant traverser le liquide par un rayon solaire ou un mince faisceau lumineux on aperçoit une fluorescence verte caractéristique plus ou moins intense suivant les quantités d'urobiline. Cette couche fluorescente présente au spectroscope la bande d'absorption de l'urobiline zincique.

Nous avons fait à l'aide de ce procédé des recherches comparatives sur des urines conservées présentant un très léger excès d'urobiline et sur des urines riches en pigments (1).

(1) Même dans les urines contenant des pigments biliaires l'extraction à l'alcool amylique conduite avec douceur, comme il a été indiqué, permet d'extraire l'urobiline et d'obtenir la fluorescence urobilino-zincique. De plus, à l'inverse de NH³, un excès de pyridine n'éteint pas la fluorescence.

Dans le premier cas, nous n'avons pu au bout de deux jours, quel que soit le mode de conservation, obtenir un résultat positif. L'urobiline, en effet, se détruisant très rapidement sous l'influence de la lumière et disparaissant complètement lorsque l'urobilinogène n'existe qu'en très léger excès à l'émission.

Mais la réaction possède toute son intensité même après plusieurs jours de conservation par l'un des moyens étudiés, lorsqu'elle a véritablement une signification clinique.

La présence du thymol, du toluène ou du cyanure mercurique ne gêne en rien la technique que nous venons de décrire.

D. Action des antiseptiques sur l'étude des constituants anormaux

LES ALBUMINES

On a signalé un grand nombre d'albumines qui peuvent se rencontrer dans l'urine, et plusieurs procédés de recherche de séparation, et de dosage ont été décrits. Nous nous sommes seulement occupé dans notre travail de la seule albumine urinaire ou *albumine vraie* : la *sérumalbumine* réunie à la *sérumglobuline*. Le meilleur procédé de dosage et l'un des plus sûrs est sans contredit le procédé pondéral après coagulation complète à chaud de l'albumine : en milieu acide et convenablement salé. Pour les petites quantités d'albumine (moins de 0 gr. 20 par litre) il convient de s'adresser au dosage par diaphanométrie tel que l'a préconisé DENIGÈS. Nous n'avons pas jugé nécessaire d'étudier l'action des antiseptiques sélectionnés sur ces deux procédés qui ne peuvent être modifiés par l'addition ou la présence de l'un d'entre eux. Nous nous sommes borné à vérifier le rôle que jouent

ces agents conservateurs vis-à-vis du réactif citropicrique, employé dans la méthode de dosage dite des dépôts. Nous n'ignorons pas toutes les objections que soulève à cet effet l'emploi de l'albuminimètre du D^r ESBACH, et les causes d'erreur qui en résultent. Toutes les fois qu'il sera nécessaire de fournir des chiffres exacts il faudra avoir recours à l'un des deux premiers procédés déjà cités, mais dans la pratique courante le tube d'ESBACH reste encore un moyen très suffisant de dosage et est utilisé d'ailleurs par la grande majorité des praticiens et des chimistes.

En observant notamment les précautions stipulées par le Formulaire des Hôpitaux militaires (1) (dilution de l'urine d'une densité supérieure à 1012), on peut apprécier d'une façon très suffisante pour les besoins de la clinique la quantité d'albumine renfermée par litre d'urine.

Si le dosage exact de l'albumine urinaire n'est, en effet, que d'une importance clinique très relative, il ne saurait en être de même lorsqu'il s'agit de se prononcer sur la nature du léger trouble se produisant à chaud dans l'urine acidifiée et qu'il est coutume d'attribuer à des *traces* d'albumine. Ces quantités indosables d'albumine peuvent orienter le diagnostic du médecin vers la lésion rénale, mais encore faut-il affirmer que l'on se trouve en présence d'albumine à signification pathologique, et non en présence de ces substances protéiques qui existent normalement dans l'urine. Ces divers composés, qui proviendraient de certains éléments figurés (cellules épithéliales), ont été englobés par GRIMBERT sous la dénomination de *pseudo-albumine*.

La coagulation par la chaleur, en outre de cette confusion, peut être encore une cause d'erreur : les urines albumineuses

(1) Form. pharmaceut. Hôpitx. milit., *loc. cit.*, page 70, tom. II.

à réaction alcaline, celles pauvres en sels et principalement NaCl, peuvent ne pas se coaguler à l'ébullition. Il est donc nécessaire pour rechercher l'albumine dans des conditions certaines de ne pas s'en tenir à cette seule épreuve, mais d'avoir recours à la réaction de HELLER et au réactif de LECORCHÉ et TALAMON (A. citrique sirupeux). L'examen microscopique, de plus, est obligatoire.

Les urines conservées au cyanure de mercure, comme celles conservées au thymol ou au toluène, sont sans action sur le réactif d'ESBACH et donnent un dépôt d'un volume comparable à celui de l'urine témoin.

La réaction de HELLER se produit également d'une façon normale. Cependant, les urines conservées au thymol donnent, ainsi que l'indiquent VILLE et DERRIEN, un disque blanchâtre, qui vient se former lentement au-dessous de la zone de contact de l'acide nitrique.

Les urines renfermant de la pseudo-albumine gardent, après leur conservation, toutes leurs propriétés vis-à-vis de la solution sirupeuse d'acide citrique. Les antiseptiques essayés sont sans action sur ce réactif.

LES SUCRES

La recherche des divers sucres (glucose, lactose, lévulose, maltose, etc.) qui peuvent se rencontrer dans l'urine s'effectue, dans la pratique, en mettant en évidence le pouvoir réducteur de ces substances, et en utilisant la propriété qu'ils ont de fournir, avec la phénylhydrazine, des composés insolubles cristallisés jaunes appelés osazones. Ces composés présentent des formes cristallines, des points de fusion différents selon le sucre qui leur a donné naissance, et permettent ainsi de les différencier entre eux.

De toutes ces glycuries, la glycosurie est de beaucoup la

plus fréquente; aussi avons-nous vérifié, au cours de nos expériences, l'action des antiseptiques sélectionnés sur les méthodes de recherche ou de dosage, à l'aide des seules urines renfermant du glycose.

RECHERCHE DU GLYCOSE. — a) *Par la liqueur de Fehling.* — Le réactif auquel le chimiste a le plus souvent recours pour la recherche du sucre est certainement la liqueur de FEHLING. Nous nous sommes donc adressé à ce procédé, mais en utilisant un mode opératoire employé déjà depuis fort longtemps au Laboratoire des cliniques de l'Hôpital Suburbain, et qui présente l'avantage de supprimer, tout en étant très sensible, les réductions douteuses que donnent certaines urines.

En diluant dans un tube à essais 5 cm³. de liqueur de FEHLING avec quatre ou cinq fois son volume d'eau distillée et en ajoutant 3 cm³. environ d'urine, on peut déceler, en portant à l'ébullition la partie supérieure du liquide, quelques centigrammes de sucre par litre.

Les urines normales conservées au thymol et au toluène soumises à cet essai ne présentent rien de particulier, mais celles renfermant du cyanure de mercure donnent ce trouble grisâtre persistant qui, pour HUGOUNENQ, est une légère réduction de la liqueur de FEHLING.

Ce phénomène n'a rien de comparable avec la réduction opérée par les sucres. En abandonnant au repos le liquide obtenu dans les conditions précédentes, ou mieux en centrifugeant, on recueille un précipité gris-argent pulvérulent : la liqueur décantée conserve la même intensité de coloration et n'a rien perdu de son titre. Il n'y a donc pas réduction *appréciable* du sulfate de cuivre, mais décomposition du cyanure de mercure suivant une réaction analogue à celle fournie par l'argent ammoniacal ou par la potasse, en présence d'aldéhyde salicylique. En milieu fortement alcalin, et sous

l'influence oxydante du sel cuivrique, le cyanure se décompose en libérant son mercure.

Nous avons utilisé cette propriété oxydante de la liqueur de FEHLING pour signaler un procédé de recherche et peut-être de dosage du cyanure mercurique; cette redoutable association chimique qui symbolisait à notre premier définitif la suprême « colle » de l'analyse.

Le procédé que nous allons décrire nous a permis d'identifier 1 milligramme de cyanure de mercure :

Dans une capsule en porcelaine on porte à l'ébullition (une minute environ) : 10 cm³. de liqueur de FEHLING étendue de son volume d'eau distillée, et 1 cm³. d'une solution à 1:1000 de Cy²Hg. On répartit le liquide, légèrement louche, dans les deux tubes d'un centrifugeur, en ayant soin de laver soigneusement le fond de la capsule. L'eau de lavage est réunie au liquide précédent. Après une centrifugation suffisante, on observe au fond des deux tubes un culot métallique. Le liquide est décanté et remplacé par une très faible quantité d'eau distillée. On agite et l'on projette cette eau chargée du précipité dans une petite capsule en porcelaine à fond rond. On rince à nouveau les tubes du centrifugeur afin d'entraîner complètement le précipité obtenu. Au bain-marie bouillant on évapore et l'on dissout, avec 5 gouttes d'eau régale, le résidu obtenu. Après évaporation à siccité, on observe au fond de la capsule une légère trainée cristalline que l'on caractérise à l'aide d'une goutte d'une solution d'iodure de potassium à 1 %₀. On obtient ainsi la coloration rouge du biiodure de mercure. La centrifugation n'est nécessaire que pour déceler des quantités de Cy²Hg ne dépassant pas 1 centigramme. Au-dessus de cette dose, le précipité de mercure est tel que l'on peut très facilement, au bout de quelques minutes de repos et après avoir décanté soigneusement, l'obtenir directement au fond de la capsule. Il ne reste plus alors qu'à laver ce précipité et le dissoudre comme précédemment dans l'eau régale. Il ne faut pas chauffer directement à feu nu, car les sels de mercure ainsi obtenus sont très volatils, et il est nécessaire de se servir d'une solution d'iodure très diluée, afin d'éviter de redissoudre le biiodure dans un excès de réactif.

b) *Par la formation de la glycosazone.* — Les urines renfermant du glucose conservées à l'aide du cyanure mercurique, du thymol ou du toluène donnent, selon la technique de PORCHER, les cristaux classiques de la phénylglycosazone.

c) *Par le réactif bismuthique de BÖTTGER-NYLANDER.* —

Nous avons voulu contrôler l'observation communiquée par BECHHOLD : D'après ce chimiste, des traces de mercure, la présence de thymol dans les urines sucrées retarderaient l'apparition du précipité noir caractéristique obtenu avec ce réactif.

Nous n'avons pu apprécier ce retard au cours de nos expériences, et l'on peut admettre que, s'il existe, il est pratiquement négligeable.

DOSAGE DU GLYCOSE. — a) *Par le procédé de CAUSSE, modifié par DENIGÈS et BONNANS.* — Ce procédé, qui utilise la liqueur de FEHLING additionnée de ferrocyanure de potassium, permet d'apprécier nettement le terme de l'opération : le ferrocyanure dissolvant au fur et à mesure l'oxyde cuivreux formé. Lorsque le sel de cuivre a été complètement réduit, la liqueur a perdu toute coloration bleue, et l'addition de I ou II gouttes de la solution sucrée fait brunir brusquement le liquide, indiquant ainsi la fin du dosage.

Des urines renfermant environ 30 grammes de glycose par litre, après trente-six heures de contact avec les trois antiseptiques essayés, déféquées au réactif de COURTONE, et convenablement diluées, se prêtaient parfaitement à l'emploi du procédé CAUSSE-BONNANS. La quantité de glycose obtenue après conservation était égale à celle de l'urine témoin.

b) *Par le polarimètre.* — Il en est de même pour le dosage au polarimètre de LAURENT, et nous avons pu constater que les très faibles quantités d'antiseptiques dissous sont sans action sur la lumière polarisée.

ACÉTONE

L'acétone, qui est un constituant normal régulier de l'urine à l'état de traces, augmente de notable façon dans

certains états pathologiques, et en particulier dans le diabète, et peut alors se traduire en grammes. Il est le plus souvent accompagné d'*acide diacétique* et d'*acide β -oxybutyrique*. La réaction de FROMMER-EMILEWICZ donne une première indication, et lorsqu'il y a lieu de procéder à un dosage, on distille l'urine en milieu acide. L'acide diacétique est ainsi décomposé, et c'est à partir de ce distillat que DENIGÈS a institué deux techniques de dosage de l'acétone totale.

Le premier procédé est long et nécessite un calcul de correction : c'est une méthode volumétrique à l'iodoforme. Ainsi que l'a montré DENIGÈS, les urines conservées au thymol faussent les résultats obtenus en fixant une certaine quantité d'iode sur le thymol pour donner de l'aristol.

Le procédé chromométrique du même auteur, basé sur le temps nécessaire à la formation brusque d'une combinaison mercurico-acétonique, est très pratique et donne d'excellents résultats. C'est à lui que nous avons eu recours pour faire nos divers dosages comparatifs. Nous lui avons fait subir la légère variante utilisée par le D^r DERRIEN, qui consiste à remplacer l'acide sulfurique, les grains de pierre ponce et le fragment de suif, par 0 gr. 50 environ d'acide picrique : La transformation de l'acide diacétique en acétone est ainsi assurée, l'ébullition est régulière, et l'on évite également la formation de la mousse.

Les temps observés en secondes pour les urines conservées sont identiques à ceux fournis par l'urine témoin.

SANG

Les méthodes chimiques employées dans la recherche de la matière colorante du sang dans l'urine ne sont pas spécifiques. « Le chimiste consulté ne pourra affirmer catégo-

riquement la présence du sang qu'avec l'appui du microscope ou du spectroscope. » (LABAT).

Mais il arrive fréquemment que les hématies sont très altérées et même détruites en totalité et ne peuvent être décelées d'une façon certaine à l'examen microscopique. D'autre part, la quantité d'oxyhémoglobine qui en résulte peut ne pas permettre l'examen spectroscopique ; dans ces conditions, la réaction de KASTLE-MEYER modifiée par TELMON et SARDOU (1) peut rendre de grands services.

En s'entourant des précautions recommandées par FLEIG, puis par LABAT (ébullition préalable de l'urine à examiner afin de détruire les peroxydases, puis en la diluant à parties égales avec une urine normale de densité plus élevée ne donnant pas la réaction), et en tenant compte des causes d'erreurs exceptionnelles signalées par TELMON, on peut admettre, lorsqu'on obtiendra une coloration franchement rouge, la présence du sang.

Etant donné les considérations très complexes qui interviennent dans ce procédé de recherche, nous nous sommes livré à toute une série d'expériences dont voici les conclusions :

Les urines ne donnant pas la réaction de KASTLE-MEYER, conservées pendant plusieurs jours à l'aide du thymol, du cyanure de mercure ou du toluène ont encore une réaction négative.

Pour les urines à réaction positive, nous avons obtenu des résultats variables pour le thymol et le toluène. La coloration rouge est peut-être moins intense que dans l'urine témoin, et, de plus, un nombre de gouttes d'eau oxygénée

(1) L. Sardou. — *Recherche clinique du sang dans l'urine*. (Thèse pour le doctorat en médecine. Montp. 1910).

plus élevé a été nécessaire pour produire la réaction. Pour des urines sanglantes conservées avec du thymol nous avons dû arriver à X gouttes au lieu de III indiquées par la technique de SARDOU. Mais ce cas n'a été qu'une exception, et généralement IV à V gouttes ont produit l'oxydation suffisante. Avec les urines renfermant du cyanure mercurique les résultats ont été constants : La réaction est certainement plus intense par rapport à l'urine témoin. E. DERRIEN (1) ayant montré, en effet, que les mercaptans inhibaient le pouvoir peroxydasique de l'oxyhémoglobine et de ses dérivés encore ferri-fères, nous avons pu admettre que le cyanure de Hg, fixant ces mercaptans qui existent toujours à l'état de traces dans l'urine, favorise la réaction en écartant ces composés gênants. Nous verrons, de plus, que par son action hémolytique très marquée, le cyanure de Hg peut encore favoriser cette réaction en faisant sortir l'hémoglobine des hématies.

BILE

Il convient de caractériser dans les urines ictériques, en dehors de l'urobiline, les pigments biliaires et les sels biliaires.

On a proposé, pour caractériser les *pigments biliaires*, diverses réactions : la plupart consistent à faire agir sur l'urine des réactifs oxydants afin de transformer la bilirubine en biliverdine.

La réaction de GMELIN est employée dans un grand nombre de laboratoires, mais elle ne donne des résultats positifs qu'avec les urines relativement riches en bile.

Le procédé institué par GRIMBERT est long et délicat, et

(1) E. Derrien. — A propos des oxydations par le système sang-peroxyde d'hydrogène. (*Bulletin de la Société Chimique de France*-4^e série, t. IX, p. 308. 1911).

LABAT a signalé certains inconvénients inhérents à cette technique. Pour toutes ces raisons, nous avons préféré nous adresser à la réaction d'OBERMAYER et POPPER, basée sur l'action oxydante de l'iode. Cette réaction est très sensible et très facile à obtenir.

Le thymol, le toluène et le cyanure mercurique ne sont pas incompatibles avec l'emploi de ce réactif.

Les *sels biliaires* sont constitués par des taurocholates ou des glycocholates alcalins. La réaction de PETTENKOFER, qui sert à caractériser ces sels est conseillée par un grand nombre d'auteurs pour reconnaître leur présence dans l'urine. Mais un procédé d'extraction est obligatoire, car il ne faut pas songer à pratiquer cette réaction directement sur l'urine sans s'exposer à des erreurs certaines. Les procédés d'extractions employés sont longs et délicats et seule la méthode de HOPPE-SEYLER offre toute garantie ; voici les séries d'opérations qu'elle nécessite (1) : Extraction des sels biliaires par formation des sels de plomb correspondants, après plusieurs extractions par l'alcool ; transformation des sels de plomb en sels de sodium. Concentration de ces sels dans l'alcool, puis précipitation par l'éther, reprise par l'eau du précipité. Sur ce liquide, et sur ce liquide seul, on peut faire enfin la réaction de PETTENKOFER, qui ne peut avoir de valeur positive qu'après l'examen spectroscopique (cette réaction n'étant pas spécifique). Les urines albumineuses demandent de plus une autre technique.

DENIGÈS (2) a proposé un procédé d'extraction trop simple ; nous n'avons pu par sa technique obtenir de résultats satisfaisants, n'ayant pu nous débarrasser complètement des chro-

(1) C. Neuberg. — *Loc. cit.*, p. 750.

(2) Denigès. — *Loc. cit.*, p. 1217.

mogènes indoxyliques et scatoliques, qui donnent des colorations brunes et des absorptions spectrales gênantes.

Nous n'envisageons bien entendu ici que les urines renfermant quelques centigrammes de sels biliaires, et non des urines intensivement bilieuses sur la valeur desquelles le médecin n'a aucun doute.

Nous avons insisté tout particulièrement sur la difficulté d'obtenir en toute sécurité la réaction de PETTENKOFER, pour bien montrer que le procédé de recherche basé sur la modification de la tension superficielle de l'urine par la présence des sels biliaires reste le seul procédé clinique utilisé dans la pratique.

La réaction de HAY repose sur ce fait que les sels biliaires diminuent la tension superficielle de l'urine : Alors que l'urine normale supporte à sa surface la légère pincée de fleur de soufre que l'on y dépose, les urines renfermant les sels de la bile permettent, par contre, au soufre de venir gagner le fond du récipient.

Cette réaction, certes, n'est pas spécifique, — certaines substances autres que les sels biliaires ayant la même propriété — mais ces substances ne se rencontrent qu'accidentellement dans l'urine et, pour cette raison, la réaction de HAY a une réelle valeur. Négative, elle a même une valeur absolue, puisque très sensible ; d'après DENIGÈS, elle permet de retrouver la présence de 0 gr. 03 centigr. de sels par litre.

Le cyanure de mercure, le toluène sont sans influence sur la tension superficielle de l'urine. Mais nous avons pu constater, au contraire, que *toutes les urines conservées au thymol donnent, après 20 heures de contact avec cet antiseptique, une réaction de HAY positive*. Si l'on mesure, en effet, à l'aide d'une pipette à un trait de 2 cm³, la tension superficielle qui est proportionnelle au nombre de gouttes, on obtient, par

exemple pour l'urine témoin à la température de $+ 15^{\circ}$:
72 gouttes pour 2 cm³.

		2 cm ³ à $+ 15^{\circ}$	
Urine témoin conservée avec un cristal de thymol	{	Après 20 h. de contact : 77 gouttes.	
		— 36 —	83 —
		— 3 jours —	89 —
		— 4 —	100 —
		— 5 —	100 —

Nous avons pu constater sur plusieurs urines conservées de la même façon, une augmentation progressive du nombre de gouttes identique à celle observée ci-dessus, puis une stabilisation à un chiffre maximum atteint au bout de quelques jours.

La présence du thymol dans l'urine ne permet donc pas d'utiliser l'excellente réaction de HAY, et si l'on fait remarquer, en outre, que cet antiseptique, soumis à la réaction de PETTENKOFER, donne une coloration jaune-brun avec, à l'examen spectroscopique, une bande d'absorption dans le rouge, il faut bien admettre que son emploi est incompatible avec la recherche des sels biliaires, pas plus qu'il ne permet d'ailleurs la détermination de la tension superficielle de l'urine

II. L'EXAMEN HISTOLOGIQUE

Méthodes d'obtention des sédiments

En vue de l'examen microscopique du sédiment urinaire, plusieurs méthodes sont utilisées pour recueillir les dépôts :
Ce sont : *le repos*, *la filtration* et *la centrifugation*.

La sédimentation par le repos s'effectue dans des verres coniques dont le fond se termine en pointe. C'est le moyen préconisé par le plus grand nombre des auteurs de précis d'analyses.

La filtration, puis l'examen pratiqué sur les dernières gouttes d'urine restant sur le filtre a été conseillée quelquefois.

La centrifugation rencontre de nombreux adversaires, qui lui reprochent, par le fait même de la condensation trop parfaite, de donner une idée erronée sur la proportion des éléments figurés contenus dans l'urine. C'est ainsi, par exemple, qu'un dépôt renfermant peu de leucocytes présentera, après la centrifugation, beaucoup de leucocytes qui résultent simplement de l'accumulation factice des premiers. Par ce moyen, on concluerait à la présence de pus, alors qu'en réalité il y aurait simple diapédèse physiologique (LETIENNE et MASSELIN).

Mais on fait grief surtout au procédé de centrifugation de détruire ou de déformer certains sédiments organisés comme les cylindres, formations microscopiques très fragiles du plus haut intérêt clinique.

Nous avons essayé à diverses reprises ces méthodes courantes, mais nous avons été amené définitivement, par une pratique d'environ dix examens microscopiques quotidiens, à n'avoir recours qu'à la centrifugation, et c'est sur le culot obtenu par ce procédé que nous nous livrerons à l'étude comparée du sédiment fourni par les urines après conservation.

La filtration, en effet, ne donne qu'une idée imparfaite de la nature du dépôt, et certains éléments figurés peuvent, de plus, se loger dans les pores du papier-filtre.

Le dépôt formé par l'urine abandonnée au repos dans des vases spéciaux, que d'aucuns considèrent comme le procédé de choix, présente au moins, à notre avis, de sérieux inconvénients.

Il nécessite, en premier lieu, un certain laps de temps que quelques auteurs réduisent parfois à une heure, mais qui, en réalité, se traduit par une douzaine d'heures environ. Or il est uniformément reconnu que l'examen microscopique doit

se pratiquer le plus près possible de l'émission. Nous avons vu, en effet, que la fermentation ammoniacale est impitoyable pour les éléments figurés. Certes, on peut ajouter des antiseptiques et empêcher cette fermentation, mais nous montrerons, dans les lignes qui vont suivre, que le meilleur est loin d'être parfait et que la meilleure façon de se livrer à l'examen microscopique de l'urine est, toutes les fois que la chose est possible, de ne pas la conserver.

C'est pour cette raison que nous n'avons envisagé que l'emploi d'un seul antiseptique compatible à la fois avec l'analyse chimique et l'examen histologique. Si l'analyse chimique doit de toute nécessité s'effectuer sur l'échantillon moyen de la totalité des urines émises en 24 heures, toutes les fois que la chose lui sera possible, le chimiste, au contraire, retirera le plus grand profit de se livrer à l'examen microscopique sur le produit d'une seule miction fraîchement émise, sans attendre, à l'abri d'une substance antiseptique, la formation d'un dépôt problématique et toujours insuffisant.

La coagulation urinaire

BOUCHARD (1) a montré, en effet, que toutes les urines subissent normalement un phénomène de coagulation. Cette coagulation s'observe dans l'urine qui se refroidit, sous la forme de nuages muqueux (*nubecula urinæ*). Elle est produite, d'après cet observateur, par une substance coagulable qui perd ses propriétés par l'élévation de la température, ou encore par la centrifugation ou la filtration. Ce n'est donc pas une substance dissoute, mais bien corpusculaire : Les cellules desqua-

(1) Bouchard. — La coagulation urinaire. (*Revue de Médecine*, Mémoires rédigés en l'honneur du P^r Lépine, p. 110. Octobre 1911).

mées ou les fragments et granulations provenant de la désintégration de ces cellules, paraissent être les corpuscules provocateurs de la coagulation urinaire.

Quoi qu'il en soit, après l'émission, des nuages légers et floconneux apparaissent et gênent considérablement la formation du dépôt. Selon leur poids spécifique, les éléments figurés se disposent sur ces corps en suspension. Si bien que le Dr RIEDER (1) propose l'examen du sédiment ainsi formé en faisant des prélèvements à diverses hauteurs.

Enfin, il a été démontré que sous l'action des diastases protéolytiques que l'urine peut renfermer, les cylindres sont rapidement détruits.

Méthode de choix : la centrifugation modérée avant la coagulation

Les reproches adressés à la centrifugation ne sont pas entièrement justifiés. Avec un peu d'expérience, on arrive facilement à apprécier à sa juste valeur l'importance du culot de centrifugation et à interpréter la signification des éléments que l'on y rencontre. C'est ainsi que l'on ne prendra jamais, par exemple pour une urine purulente, une urine qui ne contient que quelques leucocytes, l'abondance du sédiment contenu dans le tube du centrifugeur permettant une appréciation beaucoup plus exacte que celle fournie par la quantité de dépôt obtenue après repos dans un verre conique.

Quant à la destruction des cylindres urinaires, — car eux seuls peuvent être déformés ou détruits du fait de la centrifugation, — l'expérience nous a montré que cette opération, conduite à une vitesse modérée, conserve à ces for-

(1) Dr Rieder. — Atlas microscop. cliniq. *Loc. cit.*, p. 2.)

mations pathologiques l'aspect qu'elles doivent aux canalicules urinaires dans lesquelles elles ont pris naissance ; mais encore étant donné la densité de ces éléments et aussi le petit nombre qui peut exister dans des urines renfermant des traces d'albumine, nous avons pu constater que ce procédé seul permet de les retrouver.

Nous nous rangeons donc à l'avis de LANGERON (1) qui, dans son excellent Précis de Microscopie, fait de la centrifugation l'opération indispensable à toute méthode d'examen microscopique. Avec lui nous ajoutons : non seulement il faut rejeter absolument la sédimentation simple, mais il est nécessaire de centrifuger les urines dès l'émission, toutes les fois qu'il le sera permis. Les urines refroidies, même centrifugées, présentent dans le culot un fond muqueux qui vient en partie de ces *nubecula* formés secondairement. Enfin, certaines urines se troublent par dépôt d'urates ou de phosphates. Dans ce cas, le précipité abondant gêne considérablement l'examen. On peut alors pratiquer avec avantage la centrifugation à chaud vers 38° (pour dissoudre les urates), ou après addition d'acide (pour dissoudre les phosphates).

Action des antiseptiques sur l'étude du culot de centrifugation

Plusieurs salles de l'Hôpital Suburbain ayant été affectées pendant la guerre aux militaires de la XVI^e Région atteints de néphrites médicales, il nous a été permis d'examiner, dès l'émission, de nombreux sédiments urinaires, et plus spécialement ceux fournis par les urines albumineuses, dont l'examen microscopique présente un intérêt primordial.

(1) M. Langeron. — *Précis de microscopie*, p. 697, Paris. 1916.

Les urines dont le sédiment était de quelque intérêt pour nos recherches étaient conservées à l'aide du cyanure de mercure, du thymol ou du toluène, et leur culot de centrifugation examiné à nouveau au bout de trente heures. C'est le temps qui s'écoule normalement entre la première émission et l'analyse. Mais ces urines peuvent être appelées à voyager, et le chimiste ne les examinera, dans ce cas, qu'avec un retard de plusieurs jours. Nous nous sommes donc livré à un nouvel examen microscopique après six jours de contact avec ces antiseptiques.

Comme pour l'analyse chimique d'ailleurs, nous n'avons soumis les urines conservées qu'à la seule action des agents de conservation, en évitant toute altération qui aurait pu être le fait d'une fermentation ammoniacale.

Après l'observation de l'aspect du culot de centrifugation, les éléments figurés suivants ont été l'objet de nos recherches (1) :

Sédiments inorganisés	}	Cristaux divers.
		Cellules épithéliales.
		Leucocytes.
Sédiments organisés		Spermatozoïdes.
		Hématies.
		Cylindres.

ASPECT MACROSCOPIQUE DU CULOT DE CENTRIFUGATION. — L'aspect du culot de centrifugation fournit déjà un renseignement très important sur l'abondance du dépôt que présente

(1) Nous avons utilisé, avec grand profit, la technique microscopique qui consiste à placer sous le condensateur un disque en papier bleuté percé d'un petit orifice en forme de croix qui joue le rôle de diaphragme et de filtre chromatique.

l'urine, mais aussi sur sa qualité : Il peut être hématique, purulent, muqueux, etc.

Les urines conservées au cyanure mercurique, quelle que soit leur nature pathologique, présentent toujours, après leur centrifugation, un culot d'un volume égal à celui obtenu sur l'urine fraîchement émise. Cependant, pour les urines albumineuses, il est de teinte légèrement brune, le soufre de la matière albuminoïde formant avec le cyanure un sulfure de mercure qui vient colorer le sédiment.

Celles conservées au thymol et au toluène, et plus spécialement les urines sanglantes, purulentes, les urines à albumine donnent toujours un culot de centrifugation plus abondant que celui de l'émission.

Avec le thymol, il revêt la forme d'une pellicule qui se traduit sous le microscope par un fond grisâtre sur lequel repose toute la préparation, et qui fait l'effet d'un verre dépoli.

Le toluène, en dehors de ce même inconvénient, présente un ennui très sérieux : Si l'urine, pendant cette période de conservation, est soumise à des agitations répétées, ce qui peut se produire pendant son transport au laboratoire, et à plus forte raison au cours d'un voyage, une véritable émulsion se produit, et le sédiment vient alors surnager le liquide avec les gouttelettes de toluène. La centrifugation dans ces conditions arrive mal elle-même à détruire complètement cette émulsion. L'urine ne se clarifie pas, le culot est fortement pelliculé, et l'on introduit toujours dans la préparation de fines gouttelettes de toluène, qui ressemblent étrangement aux hématies.

Enfin, on peut admettre que l'addition de toluène ne permet pas la recherche de la graisse dans l'urine dans les cas de chylurie et de lipurie. Dans la chylurie, l'urine qui est

laiteuse, peut se clarifier sous l'action dissolvante du toluène. Dans la lipurie, les gouttelettes huileuses qui se rassemblent à la surface de l'urine ne sont plus perceptibles et n'attirent plus l'attention du chimiste.

Nous n'avons pas eu à notre disposition des urines d'une telle nature pathologique et nous n'avons pu vérifier ces deux hypothèses.

SÉDIMENTS INORGANISÉS. — Les sédiments inorganisés ne subissent aucune altération du fait de la présence de l'une des trois substances antiseptiques essayées. Qu'ils soient de nature organique (A. urique et urates, oxalate de calcium) ou minérale (phosphates et carbonate de calcium) ces *cristaux* et ces *granulations amorphes* se retrouvent après plusieurs jours de conservation avec tous leurs caractères.

SÉDIMENTS ORGANISÉS. — D'une conservation beaucoup plus délicate sont les sédiments organisés qui, malgré tous les antiseptiques et liquides de fixation proposés, perdent très rapidement les formes qu'ils affectaient à l'émission. Ces éléments figurés, en effet, en dehors de la protection que leur assure le cyanure de Hg, le thymol, le toluène, par exemple, contre l'ensemencement et l'action des redoutables microbes urophages, subissent l'action propre de l'urine : Les globules rouges prennent des formes variables suivant la concentration moléculaire et la réaction de l'urine qui les renferme. Dentelés ou crénelés dans les urines hypertoniques, gonflés dans les urines alcalines, décolorés dans les urines hypotoniques, ils sont même le plus souvent détruits au bout d'un temps relativement court, et c'est ainsi que PAGNEZ a montré que certaines urines sont hémotoxiques et peuvent détruire les globules rouges, soit par toxicité propre, soit par osmoticité. Nous avons signalé également l'action dissolvante des protéases vis-à-vis des cylindres urinaires.

Avec ces restrictions nécessaires, nous pouvons cependant indiquer qu'après une conservation de plusieurs jours, les diverses *cellules de l'épithélium urinaire* peuvent être encore observées sous le microscope avec profit. Notre attention a été plus spécialement attirée sur l'aspect des cellules rénales qui seules peuvent être caractérisées avec quelque sûreté, et en particulier sur la conservation des cellules rénales ayant subi la dégénérescence granulo-graisseuse qui indique une lésion déjà ancienne et grave du rein.

Le cyanure de mercure nous a fourni les résultats les plus satisfaisants, et il en a été de même pour la conservation des *leucocytes* (mono ou polynucléaires). Mais dans ce cas la conservation est liée à l'altération plus ou moins grande que ces éléments figurés peuvent déjà avoir subi dans l'organisme.

Les urines purulentes qui sont le plus souvent alcalines à l'émission, ne présentent plus après une conservation de 30 h. que des leucocytes gonflés, désagrégés et presque toujours méconnaissables. On peut utiliser alors le procédé de DONNÉ, qui consiste à battre l'urine avec une baguette de verre en présence d'un excès d'ammoniaque : Le pus donne dans ces conditions une masse filante. Ce procédé de diagnostic, indiqué dans tous les traités d'urologie ne saurait remplacer le microscope. Il est tout à fait insuffisant et ne saurait être conseillé que pour les pyuries massives.

Les urines renfermant des *spermatozoïdes* conservées au cyanure, au thymol ou au toluène, permettent, après plusieurs jours, de retrouver ces éléments figurés, dont la présence peut changer la signification des traces d'albumine constatées.

Action hémolytique du cyanure mercurique. — Si le cyanure de mercure se montre, dans une certaine mesure, le

meilleur agent de conservation des leucocytes, nous avons constaté, par contre, qu'il fait preuve d'un pouvoir hémolytique très marqué. En dehors de toute action propre à l'urine, il provoque une véritable dissolution des globules rouges.

On peut vérifier facilement cette propriété en ajoutant à une petite quantité de sang recueillie une goutte de solution de cyanure de mercure à 10 o/o. Le sérum obtenu après la rétraction du caillot ne possède plus son aspect normal légèrement teinté en jaune ; il est fortement coloré en rouge par l'oxyhémoglobine. Dans ces conditions, après plusieurs heures de conservation à l'aide du cyanure mercurique, l'examen microscopique des globules rouges n'est plus permis. Il faut avoir recours à un procédé chimique. Nous avons vu qu'en supprimant l'une des causes qui s'opposent à la bonne marche de la réaction, cet antiseptique augmente la sensibilité du réactif de KASTLE-MEYER modifié par TELMON et SARDOU, et rachète ainsi en partie l'hémolyse qu'il suscite.

Le thymol et le toluène, dans les conditions de leur emploi, sont sans action sur les globules rouges ; ils n'assurent leur conservation que dans les limites que nous avons déjà signalées.

Conservation des cylindres urinaires. — Nous avons obtenu au cours de nos recherches sur la conservation des divers cylindres urinaires, des résultats en relation avec la concentration de l'urine ; donc, probablement avec la quantité des protéases dissoutes.

Les urines albumineuses pâles, de faible densité, renfermant des cylindres, donnaient toujours, après 6 jours de conservation, une bonne préparation microscopique.

Le cyanure de Hg, qui n'ajoute jamais au culot de centrifugation cette pellicule blanchâtre fournie par le thymol et le toluène et sur laquelle vient se confondre sous le microscope

les *cylindres hyalins*, assure une longue conservation de ces derniers éléments figurés. Ils sont légèrement teintés par le sulfure de mercure formé aux dépens du soufre de l'albumine et présentent, de ce fait, des contours plus accentués. Ils affectent l'aspect des *cylindres creux* ou *colloïdes*, mais ne peuvent cependant être confondus avec ceux-ci, qui sont toujours plus larges et présentent des bords caractéristiques. Mais cet avantage devient un défaut lorsqu'il s'agit de caractériser les *cylindres granuleux*. Les granulations sont imprégnées de ce sulfure brun-noir, et il est fort difficile de les distinguer alors en *cylindres granuleux*, *granulo-grasieux* ou *granulo-hématiques*.

III. EFFICACITÉ COMPARÉE DES ANTISEPTIQUES CONTRE LA FERMENTATION AMMONIACALE

Dans les diverses recherches qui précèdent, nous nous sommes toujours placé dans des conditions de conservation certaine : nos expériences ayant été faites pendant les jours les plus froids de l'année. Nous avons recueilli les urines témoins dans des récipients aseptiques, et nous les avons conservées à l'abri des poussières de l'air. Dans ces conditions, la fermentation ammoniacale n'était pas à craindre et nous avons pu nous livrer, en toute sécurité, aux dosages et aux examens comparés des divers constituants. Les modifications d'ordre physique ou chimique ne pouvaient donc être apportées que par la substance antiseptique.

Nous avons signalé pour les uns et les autres quelques inconvénients, mais les résultats obtenus ne sauraient motiver définitivement notre choix. En fin de compte, l'analyse chimique et l'examen histologique sont entièrement subordonnés à la fermentation ammoniacale : il est donc de toute évi-

dence que l'on devra accorder la préférence à l'antiseptique qui présentera la meilleure défense de l'urine contre l'action des microorganismes qui provoque cette fermentation et contre la diastase qu'ils sécrètent.

Mais comment apprécier le pouvoir antiseptique de chacun d'entre eux ?

A. Facteurs influant sur la fermentation ammoniacale

Abandonnée à elle-même, avons-nous dit, l'urine fermente, mais avec une plus ou moins grande rapidité en fonction de facteurs divers que nous allons étudier.

Concentration. — En premier lieu la fermentation ammoniacale est en rapport avec la constitution même de l'urine : On pourrait supposer que les urines riches en urée et en sels dissous s'altèrent plus rapidement que les urines de faible densité. Il n'en est rien : Ainsi qu'il est indiqué dans C. NEUBERG (1), les urines diluées fermentent plus facilement que les urines concentrées. J. SAÏDMANN (2), dans un travail récent, a constaté que l'addition d'eau augmente la fermentescibilité des urines. Le même auteur a montré que la quantité d'acide urique dissous était sans effet sur ce phénomène.

L'urée seule est un aliment insuffisant pour les microorganismes, la fermentation languit, la présence de certains sels est nécessaire pour l'activer. D'après VON JACKSCH (3), le meilleur liquide nutritif des microorganismes urophages con-

(1) C. Neuberg. — *Der Harn...*, loc. cit.; page 39.

(2) J. Saïdmann. — Compte rendu des séances de la Soc. de Biologie, T. LXXIX, juillet 1916, page 780.

(3) VON Jacksch. — *Stud. über den Harnstof. Zeitschr. f. physiol. Chemie*, T. V. 1881.

siste en 3 gr. d'urée ; 5 gr. de sel de Seignette (tartrate double de potasse et de soude), 0 gr. 12 de phosphate acide de potassium et 0,06 de sulfate de magnésie dans 1000 gr d'eau.

MIQUEL va plus loin : il prétend que non seulement la présence d'urée n'est pas nécessaire au développement des urobacilles, mais qu'elle leur est plutôt nuisible.

Réaction. — La réaction du liquide entre également en jeu dans la marche du phénomène. On peut admettre que la fermentation ammoniacale s'établit avec une vitesse qui est en raison inverse de l'acidité.

Le milieu alcalin la favorise. En milieu acide le *micrococcus ureæ* vit péniblement. Cette alcalinité lui convient d'autant mieux qu'elle est nuisible aux mucédinées, aux levures et aux mycodermes, ces ennemis naturels du ferment de l'urée. Dans le monde des infiniment petits, la lutte pour l'existence se livre avec autant d'acharnement que parmi les autres espèces du monde vivant. L'alcalinité du liquide offre à l'urobacille de PASTEUR une véritable protection contre un grand nombre d'êtres microscopiques qui pourraient être tentés de lui disputer du terrain.

Air et lumière. — MIQUEL, à l'aide d'une technique spéciale, a montré l'anaérobiose des bactériens urophages.

La lumière aurait également une influence sur la vie du ferment, mais cependant sans lui être indispensable (VAN TIEGHEM).

État clinique du malade. — Il n'est pas jusqu'à l'état de santé de l'individu qui, d'après SAIDMANN, n'influerait la fermentescibilité des urines. Cet auteur a même voulu y voir un élément de pronostic. C'est ainsi que la comparaison de cette fermentescibilité avec l'évolution clinique lui a montré que les malades gravement atteints, dont les urines fermentaient normalement, ont guéri (excepté un cas). Ceux chez

qui la fermentescibilité, très grande d'abord, a diminué régulièrement, se sont améliorés ; ceux chez qui elle est restée élevée ou a augmenté ont succombé.

Mais toutes choses restant égales, la fermentation s'établit plus vite encore pour des urines à constituants pathologiques.

VAN TIEGHEM déjà avait montré que les substances albuminoïdes étaient favorables au développement de la torulacée alors que les phosphates et le sucre ne lui assurent eux-mêmes qu'une existence tout à fait éphémère.

Avant lui, LIEBIG, DUMAS avaient invoqué l'influence du mucus vésical, du pus et du sang. En 1881, Ch. RICHET (1) démontra qu'un fragment de tissu musculaire placé dans une solution d'urée la faisait fermenter.

Pour les urines sucrées, la fermentation alcoolique tend à se produire tout d'abord, retardant ainsi la transformation de l'urée.

Les urines sanglantes, mais surtout les urines renfermant du pus, sont susceptibles de s'altérer plus rapidement. Sauf dans les cas de tuberculose rénale, où l'urine est parfois hyperacide, les urines purulentes sont le plus souvent alcalines et ont même subi un commencement de fermentation intravésicale.

Température. — Mais l'un des facteurs qui joue le rôle le plus important dans la conservation de l'urine est la température à laquelle cette dernière est soumise.

Pour PASTEUR, VAN TIEGHEM, MIQUEL, les températures de 40° à 50° favoriseraient le mieux l'action du ferment. VON JASCKSCH estime, au contraire, que la température optima correspond à 30-33°.

(1) Ch. Richet. — Compte rendu Acad. Sciences 1881, p. 730.

« BOCALITE ». — Enfin, l'une des causes qui provoque le plus souvent la fermentation ammoniacale et sur laquelle l'attention du chimiste doit être plus spécialement attirée, est la façon toujours défectueuse dont l'urine est recueillie en vue d'être soumise à l'analyse. Il n'est pas mauvais de rapporter ici les termes dont se sert BLAREZ (1) pour décrire, non sans ironie, le procédé habituel de prélèvement : « Neuf fois sur dix, on prend un petit flacon qui a pu contenir n'importe quoi, on le rince quelquefois, on le remplit avec l'urine qui se trouve dans un vase plus ou moins propre, et contenant le plus souvent la dernière émission, que ce soit celle du soir, que ce soit celle du matin, et après avoir bouché le flacon avec un bouchon ayant servi à n'importe quel usage, on l'apporte à son pharmacien pour qu'il en fasse l'examen ».

Et c'est ainsi le plus souvent, en effet, que l'on remet au chimiste une urine qui a perdu en partie les caractères qu'elle présentait à l'émission et dont l'examen microscopique, en dehors de nombreuses bactéries, des champignons et des levures, devient une véritable énigme. Bref, une de ces urines que, très spirituellement, un de nos distingués urologistes a déclaré atteinte de « bocalite ».

B. Choix d'un criterium

INSUFFISANCE DE L'ACIDITÉ APPARENTE. — Au cours de ses expériences, HUGUET s'est basé, pour apprécier quelques-unes des substances utilisées pour conserver les urines, sur la seule observation des modifications apportées à l'acidité apparente par la fermentation ammoniacale : certains

(1) Blarez. — *L'urine*. 1907.

auteurs attribuant à l'acidité urinaire une extrême importance.

Nous n'avons pas à apprécier ici la valeur clinique de cette expression conventionnelle, mais nous ne pouvons admettre avec HUGUET que seul le dosage de l'acidité directe, en présence de phénolphthaléine soit le criterium d'une bonne conservation.

Nous avons pu constater trop fréquemment au cours de nos expériences combien cette acidité dépend de certains facteurs qui interviennent dans le virage du réactif indicateur. C'est ainsi que C. MAYER (1) rappelle que telle urine, alcaline au papier de tournesol, peut avoir une acidité directe mesurée à la phénolphthaléine plus grande, et réciproquement d'ailleurs. Ces résultats contradictoires, en apparence, expliquent pourquoi les cliniciens préfèrent souvent se tenir complètement à l'écart de ces questions d'acidité urinaire et même le discredit qui s'y attache.

Aussi MAYER propose-t-il d'exprimer d'une façon beaucoup plus rationnelle l'acidité, non plus par litre d'urine, mais pour cent de matières fixes, en calculant l'extrait sec au moyen de la densité.

Le coefficient d'acidité, ainsi défini par cet auteur, est donné par le rapport :

$$\frac{\text{Acidité par litre} \times 100}{\text{Extrait sec}}$$

LES FERMENTATIONS NON AMMONIACALES DE L'URINE. — La mesure de la réaction urinaire ne peut être le témoignage absolu d'une conservation parfaite, car l'acidité directe est

(1) C. Mayer. — *Bullet. Soc. chimiq. de France*. 4^e série, t. XXI, janvier 1917, p. 21.

susceptible de se modifier au sein même de l'urine, sous l'influence de certaines fermentations que nous trouvons résumées dans C. NEUBERG (1).

Fermentation avec formation d'acides gras volatiles (A. formique, butyrique, acétique).

Fermentation hydrothionique. L'augmentation de l'acidité serait due dans ce cas à la décomposition des substances sulfurées de l'urine avec dégagement d'hydrogène sulfuré.

Fermentation glaireuse, décrite par les Italiens sous le nom de glischurie.

Fermentation avec formation de gaz (H , CO^2 , CH^4) observée surtout chez les diabétiques et connue sous le nom de pneumaturie (lorsque les gaz se forment dans la vessie).

Certes, ces deux dernières fermentations constituent de très rares exceptions résultant d'un état pathologique, mais nous avons pu observer, à diverses reprises et après plusieurs jours de conservation, des acidités apparentes plus élevées vis-à-vis des réactifs indicateurs que dans la première analyse. Ce phénomène a été observé depuis fort longtemps déjà et MÉHU (2) a décrit en 1880 une *fermentation acide* qu'il suppose être due à la formation d'acide lactique.

CRITERIUM DE CHOIX : L'ACIDITÉ LIBÉRÉE PAR LE FORMOL. — Pour toutes ces raisons et pour nous rendre compte d'une façon certaine si l'urine est en voie de fermentation ammoniacale, nous avons cru préférable de baser nos appréciations sur la méthode préconisée par OTTO FOLIN (3) et qui consiste à faire des dosages comparés d'ammoniaque. L'urine normale renferme à l'émission une certaine quantité d'ammoniaque,

(1) C. Neuberg. — *Loc. cit.*, p. 39.

(2) Méhu. — *L'urine*. 1880, p. 32.

(3) Otto Folin. — *Loc. cit.*, p. 282.

qui, échappant à la transformation en urée, est venue neutraliser en partie les acides sulfuriques, phosphoriques, etc., pour donner les sels ammoniacaux correspondants. Or, ainsi que l'a montré RONCHÈSE, lorsqu'on ajoute à une solution neutre du sel ammoniacal une solution neutre de formol, le mélange devient acide à la phénolphtaléine par mise en liberté de tout l'acide uni à l'ammoniaque et formation d'hexaméthylènetétramine neutre à la phénolphtaléine. La réaction peut s'exprimer en partant du chlorure d'ammonium, par exemple :



En neutralisant 10 cm³ d'urine par la solution de soude N/10 en présence de phénolphtaléine (on a ainsi l'acidité directe), puis, en ajoutant une solution *neutre* de formol (20 cm³), on libère donc une nouvelle acidité, que l'on détermine à l'aide de la même solution titrée alcaline. Du nombre (n) de centimètres cubes nécessaires pour obtenir le second virage, on peut déduire l'ammoniaque que renferme l'urine par litre ($n \times 0.176$).

Il est facile de se rendre compte combien, grâce à ce procédé, on peut établir, à l'aide d'un nouveau dosage, la quantité d'ammoniaque qui résulte d'une formation secondaire aux dépens de l'urée à la suite d'une mauvaise conservation.

Le rapport $\frac{\text{azote formol}}{\text{azote hypobromique}}$ devient alors le véritable *coefficient de fermentation ammoniacale*. Le numérateur seul augmentant, l'hypobromite de sodium dégageant à la fois l'azote de l'urée et l'azote ammoniacal : le dénominateur reste le même. Ce rapport du fait de la fermentation tendra donc vers 1.

C. Les trois épreuves permettant de juger la valeur d'un antiseptique urologique

Pour juger la valeur des divers antiseptiques, il faut compter avec la possibilité de la fermentation :

Nous avons vu que le plus souvent l'urine est recueillie dans des récipients malpropres, généralement le vase habituel, qui peut renfermer les microorganismes de la fermentation ammoniacale, il y a donc là un véritable ensemencement. Mais la conservation est surtout nécessaire pendant les jours très chauds de l'été : Il fallait donc nous placer dans certaines conditions pour réaliser ces deux épreuves auxquelles peut être soumis tout antiseptique urologique digne de ce nom.

Une troisième épreuve cependant, de beaucoup la plus sérieuse, peut leur être réservée : Certaines urines, souvent purulentes, ont déjà subi dans la vessie un commencement de fermentation ammoniacale. Plus que pour toutes autres peut-être, il importe d'assurer leur conservation. Sans doute, certaines données de l'analyse n'ont plus aucune valeur, mais en pouvant affirmer la réaction alcaline et ammoniacale à l'émission, et surtout en enrayant la fermentation qui, plus accentuée, viendrait compromettre définitivement l'examen histologique, on fournit encore au clinicien des renseignements précieux, qui peuvent éclairer dans une certaine mesure son diagnostic et le diriger vers la région rénale ou l'affection vésicale.

Nous avons donc établi, pour fixer définitivement notre choix, trois séries d'expériences, que nous avons renouvelées plusieurs fois et dont nous donnons plus loin, pour chacune d'entre elles, les protocoles détaillés.

CONSERVATION DE L'URINE BIEN RECUEILLIE. — Dans une première série, nous avons recueilli une urine normale mixte dont

nous avons dosé l'ammoniaque. Cette urine a été ensuite distribuée dans des flacons à large ouverture, rincés comme le récipient initial à l'eau distillée bouillante et égouttés. Ces flacons, qui renfermaient déjà l'antiseptique à essayer, ont été exposés pendant une demi-heure aux poussières de l'air, puis placés, après avoir été bouchés, dans une étuve à $+25^{\circ}$. Nous avons fait toutes nos expériences de conservation à cette température qui réalise la température moyenne de l'été, mais qui peut être largement dépassée. Grâce à l'obligeance de M. le professeur agrégé LAGRIFFOUL, médecin-chef du centre de bactériologie de la XVI^e Région, nous avons pu disposer d'une étuve qui nous a permis de réaliser ces conditions.

Dans cette première expérience, nous admettons donc que l'urine recueillie d'une façon convenable, dans des récipients propres, est en contact dès l'émission avec l'antiseptique. L'urine n'a pu êtreensemencée que par la contamination toujours possible au niveau des orifices d'excrétion et par les poussières de l'air qui tombent dans le récipient pendant la durée des émissions. Nous avons estimé ce temps à une demi-heure environ, bien qu'en réalité le bocal reste le plus souvent découvert pendant toute la durée du prélèvement.

CONSERVATION DE L'URINE ENSEMENCÉE. — Mais les urines peuvent être recueillies dans de bien plus mauvaises conditions, et le rôle de l'antiseptique doit pouvoir se manifester d'une façon beaucoup plus énergique que précédemment. Elles peuvent être reçues et séjourner pendant 24 heures dans les récipients habituels, qui renferment toujours, surtout l'été, quelques-uns de ces nombreux agents de la fermentation ammoniacale.

C'est à cette épreuve de l'urineensemencée que nous avons soumis, dans une deuxième série d'expériences, les divers

antiseptiques. Pour cela faire, nous avons suivi la technique employée par les expérimentateurs qui ont déjà étudié la fermentation ammoniacale de l'urine : après avoir ensemencé l'urine témoin, en y déposant quelques parcelles de la pelli-cule blanchâtre qui se forme sur l'urine en fermentation ammoniacale, nous l'avons répartie comme précédemment.

ACTION ANTIURÉASIQUE. — Enfin, dans une troisième série d'expériences, nous avons envisagé la conservation possible d'une urine ayant déjà subi une fermentation intravésicale et dont le culot de centrifugation présentait à l'émission de nombreuses hématies et de nombreux leucocytes pyoïdes, quelques cylindres granulo-hématiques et des cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien. L'antiseptique, dans ce cas, avait à lutter non seulement contre le développement des microbes urophages, mais surtout contre le ferment soluble déjà sécrété : l'uréase.

Des travaux récents dus à des savants japonais (1) et américains (2) ayant mis en valeur l'activité considérable de l'uréase renfermée dans la graine du *Soja hispida* Mœnch, nous avons également expérimenté les antiseptiques sélectionnés sur l'action de la diastase retirée de cette légumineuse.

**

Après un séjour de 24 heures dans l'étuve à 20 degrés, ces divers échantillons ont été soumis à un nouveau dosage d'ammoniaque, puis, enfin, au bout de 6 jours, durée de

(1) Takeuchi. — *Journ. of the Coll. of Agricull.* Part. 1, pag. 1. Tokio, 1909.

(2) D. van Slyke and E. Cullen. — A permanent preparation of urease and its use in the determination of urea. (*Journ. of biological chemistry*, t. XIX, p. 211. Oct. 1914).

conservation maxima, qui peut être exigée dans la pratique d'un bon antiseptique.

Nous avons donc étudié, à l'aide de ces trois épreuves, les propriétés antiseptiques du *cyanure de mercure* (0 gr. 20 par litre), du *thymol* (un cristal par récipient), du *toluène* (L gouttes par litre). Ayant constaté, dans les chapitres précédents, les ennuis qu'entraîne l'emploi de ces trois substances, nous leur avons adjoint, dans ces expériences, le *camphre* (quelques grains), l'*essence de menthe* (L gouttes par litre), l'*essence de moutarde*, préconisée par DEBAINS et selon son indication (X gouttes par litre d'une solution alcoolique au 1/5^{me}), et l'*eucalyptol* (L gouttes p. 0/00).

CONSERVATION DE L'URINE BIEN RECUEILLIE

Urine témoin

Recueillie le 8 février à 14 h. 30

Limpide
Acidité directe = 320 cm³ NaOH N/10 p. litre.
 (à la phénolphthal.)
Acidité Formol { 385 cm³ — id. —
 0,677 en NH³ par litre.

Soumise à l'étuve à + 25°, à 15 heures.

Date de l'analyse	Antiseptique	Aspect	Acidité directe	Acidité Formol	
				en NaOH N/10	en NH ³
Février 10 " 14	Cy ³ Hg	Limpide "	345 330	385 385	0,677 0,677
Février 10 " 14	Thymol	Légèrem ^t louche Louche	350 330	420 440	0,739 0,774
Février 10 " 14	Toluène	Légèrem ^t louche Louche	340 330	410 430	0,721 0,739
Février 10 " 14	Essence de Moutarde	Légèrem ^t louche "	340 325	410 430	0,721 0,739
Février 10	Camphre	En complète putréfaction			
Février 10	Ess. de Menthe				
Février 10	Eucalyptol				

Alcalines à la Phénolphtaléine

CONSERVATION DE L'URINE ENSEMENCÉE

Urine témoin

Recueillie le 18 février à 14 h. 30

Limpide.

Acidité directe = 430 cm³ NaOH N/10 p. litre.

480 cm³ — id. —

Acidité Formol } 0,844 en NH³ par litre.

Ensemencée et soumise à l'étuve à + 25°, à 45 heures.

Date de l'analyse	Antiseptique	Aspect	Acidité directe (1)	Acidité Formol	
				en NaOH N/10	en NH ³
Février 20 " 24	Cy ² Hg	Limpide "	430 420	480 490	0,844 0,862
Février 20 " 24	Thymol	Trouble Odeur ammoniacale en complète putréfaction	30 — 300	1420 3090	2,49 5,33
Février 20 " 24	Toluène	Louche Très louche	390 370	510 555	0,897 0,976
Février 20 " 24	Essence de Moutarde	Louche Très louche	390 370	520 550	0,915 0,960

(1) Le signe — indique une alcalinité par litre exprimée en cm³ de HCl N/10.

Urine témoin *Louche.*

Recueillie le 9 mars à 10 h. 45

$\left\{ \begin{array}{l} \text{Acidité directe} = 60 \text{ cm}^3 \text{ NaOH N/10 p. litre.} \\ \text{Acidité Formol} \quad \quad \quad \left\{ \begin{array}{l} 340 \text{ cm}^3 \text{ — id. —} \\ 0,598 \text{ en NH}^3 \text{ par litre.} \end{array} \right. \end{array} \right.$

Cette urine, qui renferme 4 p. 20 d'albumine par litre, présente à l'émission un petit culot de centrifugation constitué par de nombreux cylindres granulo-hématiques, plusieurs leucocytes pyoïdes et des cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien.

Soumise à l'étuve à + 25°, à 12 h. 15.

Date de l'analyse	Antiseptique	Acidité directe	Acidité Formol		Examen microscopique
			en NaOH N/10	en NH ³	
Mars 11 » 15	Cy ² Hg	50 40	350 365	0,616 0,642	Même après 6 jours de conservation : culot de centrifugation de même volume. Les divers éléments figurés peuvent être observés à nouveau.
Mars 11	Thymol	— 200	940	1,65	Culot volumineux. En dehors des nombreuses bactéries et levures on ne peut déceler que de très nombreux cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien.
Mars 11	Toluène	— 220	1030	1,81	Même observation
Mars 11	Ess. de Moutarde	— 50	720	1,26	Même observation

ACTION ANTIURÉASIQUE. — B. FERMENTATION PROVOQUÉE PAR LA DIASTASE DU SOJA HISPIDA

Urine témoin

Recueillie aseptiquement le 10 juin, à 18 h.

Acidité directe = 270 cm³ NaOH N/10 p. litre.
Acidité Formol { 320 cm³ — id. —
 , 0,563 en NH³ par litre.

Additionnée avec 1 o/o d'une émulsion obtenue en triturant 5 graines décortiquées de *Soja hispida* avec 50 cm³ d'eau salée.

A la température de + 22°.

Date de l'analyse	Antiseptique	Acidité directe	Acidité Formol	
			en NaOH N/10	en NH ³
Juin 11 (12 h.) „ 13 (15 h.)	Cy ² Hg	260 260	330 330	0,580 0,580
Juin 11 (12 h.) „ 13 (15 h.)	Thymol	— 390	1770	3,115
Juin 11 (12 h.) „ 13 (15 h.)	Toluène	— 400	1820	3,203
Juin 11 (12 h.) „ 13 (15 h.)	Essence de Moutarde	20	790	1,390

QUATRIÈME PARTIE

ÉTUDE COMPLÉMENTAIRE ET PRATIQUE DU CYANURE DE MERCURE

Choix du cyanure de mercure

INCONVÉNIENTS DES AUTRES ANTISEPTIQUES ÉTUDIÉS. — Les diverses substances que nous avons expérimentées en dehors des trois antiseptiques généralement employés pour la conservation de l'urine aux fins d'analyse se sont montrées, dès la première épreuve, d'une efficacité tout à fait insuffisante. Leur action est nulle sur des urines pathologiques (purulentes ou sanglantes), et à plus forte raisonensemencées. Au bout de quelques heures, de telles urines dégagent déjà des vapeurs bleuisant le papier de tournesol.

Le *camphre*, conseillé par quelques auteurs, ne saurait être plus longtemps préconisé. L'*essence de menthe* et l'*eucalyptol* sont sans effet sur le développement des microorganismes. Leur rôle paraît se borner à former au-dessus de l'urine une couche isolante et protectrice contre les germes apportés par les poussières de l'air. Ce procédé n'est pas pratique, puisqu'il nécessite une grande quantité d'huile essentielle pour former une nappe liquide dans les récipients de grand diamètre habituellement employés pour recueillir l'urine.

L'*essence de moutarde* en solution alcoolique, ainsi que l'a préconisée DEBAINS, fait preuve d'un réel pouvoir antiseptique.

Nous avons cependant obtenu des résultats tout à fait contradictoires avec des essences ou des solutions alcooliques déjà anciennes. Dans ces conditions, nous avons pu constater que son action est inopérante.

Les résultats que nous indiquons dans nos tableaux d'analyse et qui sont satisfaisants, tout au moins pour les urines n'ayant pas subi déjà une fermentation intravésicale, sont obtenus avec une essence récemment préparée, et mélangée à l'alcool au moment de l'usage.

Nous pensons que ces conditions doivent toujours être réalisées pour obtenir une conservation certaine à l'aide de cet antiseptique.

Cependant, les doses indiquées par DEBAINS sont très faibles; nos expériences ont été faites en flacons bouchés, mais on peut prévoir, surtout pendant la période chaude de l'été, une évaporation rapide de cette faible quantité d'essence qui se trouverait exposée directement à l'air dans les procédés habituels de récolte de l'urine. DEBAINS insiste surtout sur l'examen bactériologique, et a pu retrouver, grâce à ce procédé de conservation, après plusieurs années, des bacilles de Koch. On peut faire remarquer que les urines de certains tuberculeux urinaires présentent à l'émission une hyperacidité qui peut même augmenter par la suite et offrent une résistance bien connue à la fermentation ammoniacale.

Des trois antiseptiques habituels, le *thymol*, dont l'usage est le plus fréquent, ne répond pas à ce que l'on peut demander à un bon agent de conservation. Dès que la température s'élève et lorsque, pour une cause quelconque, il y a ensemencement de l'urine, il devient tout à fait incapable de s'opposer à la fermentation ammoniacale. Il masque de plus l'odeur de l'urine et il présente quelques ennuis au cours de l'analyse. Il prive enfin le chimiste de l'excellente réaction de HAY.

Le *toluène*, tout au moins dans le cas qui nous occupe, a un pouvoir antiseptique bien plus marqué que le thymol. Il s'oppose énergiquement au développement des êtres organisés et les empêche d'exercer leur action habituelle. Mais il est sans effet sur le ferment soluble lorsque celui-ci existe dans l'urine. Ce fait, d'ailleurs, est bien connu des chimistes américains, qui utilisent le toluène comme antimicrobien dans leurs études sur l'action diastasique de l'uréase. S'il masque complètement l'odeur et s'il nécessite, en vue des diverses opérations de l'analyse, une décantation minutieuse, il ne présente pas d'incompatibilité vis-à-vis des réactifs chimiques habituels.

Mais dès que l'urine subit une agitation marquée, le toluène produit une véritable émulsion : l'aspect du liquide est notablement modifié, et ce fait se remarque surtout pour les urines albumineuses présentant un certain dépôt. Les sédiments sont entraînés à la surface et, tout comme avec le thymol, le culot de centrifugation est augmenté et présente une pellicule blanchâtre qui gêne l'examen microscopique.

AVANTAGES DÉCISIFS DU CYANURE DE MERCURE. — De l'exposé qui précède, il résulte très nettement que le cyanure de mercure est le plus puissant agent de conservation de l'urine. Il est le seul, en effet, qui nous ait donné des résultats entièrement satisfaisants par son action directe sur le développement des microbes urophages et sur l'activité du ferment soluble que ces derniers sécrètent. *Seules les urines conservées avec cet antiseptique permettent d'établir le rapport azoturique et le rapport de Maillard avec certitude*, et de fournir ainsi au médecin un enseignement précieux, qui est le reflet de l'état clinique du malade et non un résultat erroné dû à un processus microbien intra-urinaire. Nous avons vu d'autre part que l'emploi

•

du cyanure mercurique n'est incompatible ni avec l'analyse chimique, ni avec l'examen histologique.

SES INCONVÉNIENTS. — Les phénomènes de libération de mercure que présentent les urines conservées au cyanure mercurique en présence de certains réactifs ne constituent pas un obstacle sérieux à son emploi. La réaction qui se produit avec la liqueur de FEHLING ne peut être confondue avec une réduction occasionnée par la présence du glycose. Dans la réaction de FROMMER-EMILEWICZ, le précipité métallique de mercure ne gêne en rien la perception de l'anneau coloré qui se forme au contact de la pastille de potasse.

Sa combinaison avec les mercaptans rend l'odeur de l'urine plus aromatique, mais vient augmenter la sensibilité du réactif de KASTLE-MAYER dans la recherche du sang. Cette dernière propriété vient compenser en partie le pouvoir hémolytique très marqué dont il fait preuve et qui entraîne très rapidement la destruction des globules rouges. Malgré ce défaut, le cyanure de mercure reste le meilleur agent de conservation en vue de l'examen histologique. Il est le seul qui, invariablement après plusieurs jours de conservation, nous ait donné un culot de centrifugation de même volume et de même aspect que celui obtenu dès l'émission.

On peut lui adresser cependant deux reproches sérieux qui pourraient le faire rejeter définitivement par certains : En premier lieu, son emploi est une cause d'erreur dans le dosage des corps puriques en bloc par la méthode HAYCRAFT-DENIGÈS ; mais c'est surtout un toxique violent qui engage la responsabilité du chimiste ou du pharmacien qui le délivrent.

Le cyanure de mercure venant incontestablement se placer au premier rang des antiseptiques utilisés en vue de la conservation de l'urine, nous nous sommes appliqué à cor-

riger et à atténuer dans une certaine mesure les inconvénients signalés.

Détermination de la dose minima efficace.

Et tout d'abord, peut-on réduire la quantité de cyanure indiquée par HUGUET comme étant nécessaire à la conservation des diverses émissions pendant 24 heures ? Déjà, DENIGÈS indique une dose d'antiseptique moins élevée : 0 gr. 10 par litre. Le Formulaire des Hôpitaux Militaires préconise 5 cm³ d'une solution à 1 : 50 pour le cycle des 24 heures. C'est donc la moitié de la dose prescrite par HUGUET. Il est vrai de dire que le même ouvrage conseille d'introduire une nouvelle quantité de cyanure mercurique (2cm³ de solution au 1/50) dans le récipient, de 500 cm³ environ, destiné à recevoir l'échantillon moyen.

Nous avons donc repris avec des doses plus faibles d'antiseptique nos expériences précédentes. Divers essais ont été faits également avec des urines pathologiques. Nous avons toujours constaté que des traces de cyanure de mercure empêchent l'ensemencement des microorganismes de la fermentation ammoniacale. Les résultats obtenus avec deux centigrammes de cyanure par litre sont aussi satisfaisants que ceux fournis par le toluène et supérieurs à ceux du thymol :

URINE BIEN RECUEILLIE

Urine témoin Recueillie le 10 février à 15 h.	Acidité directe : 270 cm ³ NaOH N/10 p. litre.
	Acidité Formol { 300 cm ³ — id. — 0,528 en NH ³ p. litre.

Soumise à l'étuve à + 25°, à 17 heures.

Date de l'analyse	Antiseptique par litre d'urine	Acidité directe	Acidité Formol	
			en cm ³ NaOH N/10	en NH ³
Février 12	Cy ² Hg 0 gr. 10	285	300	0,528
» 16		280	315	0,554
Février 12	Cy ² Hg 0 gr. 05	285	300	0,528
» 16		280	320	0,563
Février 12	Cy ² Hg 0 gr. 025	280	315	0,554
» 16		265	325	0,572
Février 12	Cy ² Hg 0 gr. 015	270	325	0,572
» 16		260	340	0,598

Les urinesensemencées nous ont montré le pouvoir antiseptique considérable du cyanure mercurique. Des urines qui étaient en complète putréfaction après 20 heures d'étuve et malgré la présence du thymol, présentaient encore après 6 jours de conservation avec 2 centigr. 5 de Cy² Hg une quantité d'ammoniaque sensiblement égale à celle de l'émission.

Voici d'ailleurs les résultats obtenus :

URINE ENSEMENCÉE

Urine témoin	{	Acidité directe :	330 cm ³ NaOH N/10 p. litre.
			330 cm ³ — id. —
		Acidité formol	0,580 cm ³ en NH ³ p. litre.

Ensemencée et mise à l'étuve à 25°, le 3 mars

Date de l'analyse	Antiseptique par litre d'urine	Acidité directe	Acidité Formol	
			en cm ³ NaOH N/10	en NH ³
Mars 5	Thymol (un cristal)	— 200	1050	1,84
Mars 5 „ 9	Cy ² Hg 0 gr. 10	330 325	330 340	0,580 0,598
Mars 5 „ 9	Cy ² Hg 0 gr. 05	330 320	330 350	0,598 0,610
Mars 5 „ 9	Cy ² Hg 0 gr. 025	320 290	335 360	0,590 0,633

L'action du cyanure mercurique sur l'uréase est aussi manifeste que dans les expériences précédentes, cependant, les doses très faibles que nous pouvions envisager jusqu'ici n'ont pas été suffisantes pour enrayer complètement la fermentation commencée dans la vessie.

URINE EN FERMENTATION INTRAVÉSICALE

Urine témoin	{	Acidité directe : 100 cm ³ NaOH N/10 p. litre.
		280 cm ³ — id. —
		Acidité Formol { 0,492 NH ³ par litre.

Soumise à l'étuve à 25°, le 10 mars

Date de l'analyse	Antiseptique par litre d'urine	Acidité directe	Acidité Formol	
			en cm ³ NaOH N/10	en NH ³
Mars 12	Toluène (L gouttes)	— 210	980	1,72
Mars 12	Cy ² Hg 0 gr. 10	95	290	0,510
» 16		80	320	0,563
Mars 12	Cy ² Hg 0 gr. 05	80	320	0,563
» 16		30	540	0,950
Mars 12	Cy ² Hg 0 gr. 025	10	720	1,26

La conservation d'une telle urine est de beaucoup la plus sérieuse épreuve à laquelle on puisse soumettre un antiseptique. La dose de cinq centigrammes de Cy² Hg par litre nous a toujours suffi pour assurer la conservation des urines albumineuses, sucrées ou purulentes, pendant une période d'au moins 6 jours et à une température de + 25°. Nous avons même obtenu des résultats suffisants avec 25 milligrammes par ‰. Pour les urines ayant subi une fermentation intravésicale, cette dernière dose est même beaucoup plus efficace que le toluène. On peut donc admettre, puisque pour de telles urines le coefficient de MAILLARD n'offre

plus le moindre intérêt, qu'il importe surtout d'assurer la conservation en vue de l'examen histologique. La fermentation ammoniacale avec 0 gr. 05 de cyanuré par litre est suffisamment enrayée pour réaliser cette condition.

Nous nous sommes donc arrêté définitivement à cette dose très faible d'antiseptique, qui peut même n'être pas considérée comme la dose minima et qui assure dans les plus mauvaises conditions de prélèvement et de température, une conservation d'une longue durée. C'est ainsi que plusieurs urines conservées de cette façon depuis plus de trois mois sont encore acides au papier de tournesol.

MIQUEL d'ailleurs, avait déjà signalé que le biiodure de mercure à la même dose (1 : 20.000) était capable de s'opposer efficacement pendant au moins un mois à la fermentation d'un litre d'urine *artificielle*ensemencée par l'*Urobacillus Pasteurii*.

Il a pu montrer également (1) que les sels de mercure, en général, sont les composés métalliques dont l'action se fait sentir le plus puissamment sur les solutions d'uréase, et qu'ils agissent sur elles à doses infinitésimales, souvent inappréciables aux réactifs les plus sensibles de la chimie.

C'est ainsi que 1 : 1.000.000 de sublimé détruit la moitié de l'énergie de la diastase mise en expérience, et que 1 : 500.000 du même sel fait disparaître complètement cette énergie.

Nous avons limité nos expériences à l'action de l'uréase dans l'urine. Nous avons été conduit à admettre que si les doses infinitésimales indiquées par MIQUEL n'ont pas suffi à maîtriser cette action diastasique, c'est que l'urine renferme des composés sulfurés (notamment des traces de mercaptaus)

(1) Miquel. *Loc. cit.*, p. 315.

qui annihilent une certaine quantité de cyanure de mercure et nécessitent, de ce fait, l'addition de quelques centigrammes de cet antiseptique.

Le cyanure de mercure fait montre d'un pouvoir antiseptique tout aussi énergique vis-à-vis des divers liquides de l'organisme. C'est ainsi que nous avons conservé pendant plus de 5 mois un sérum renfermant 3 gr. 35 d'urée par litre. Ce procédé de conservation peut rendre de grands services lorsque le clinicien ne dispose pas d'un laboratoire et que le sérum doit être appelé à voyager. Dès que 15 cm³ de sérum sont obtenus, on les recueille dans un flacon de même volume soigneusement lavé à l'eau bouillante et séché et dans lequel on a introduit ensuite deux gouttes d'une solution de cyanure de mercure à 50/o. La conservation est largement assurée pour plusieurs mois.

Cette action antiseptique si énergique du cyanure de mercure a d'ailleurs pu être utilisée dans le domaine clinique ; grâce à DENIGÈS, la causticité propre des sels de mercure a pu être supprimée par l'introduction du borate de sodium à la solution titrée de cyanure. C'est cette combinaison cyanuro-boratée qui est employée avec grand succès dans certaines affections des voies urinaires sous forme de lavages à 1 pour 4.000.

Les propriétés antiseptiques si puissantes du cyanure de mercure ainsi démontrées, il est vraiment regrettable que certains auteurs aient pu l'indiquer à des doses qui, pour être imprécises, n'en restent pas moins exagérées et ont pu le faire discréditer. C'est ainsi que nous lisons dans un manuel de technique destiné aux cliniciens, que l'on obtient une bonne conservation de l'urine à l'aide de *quelques cristaux* de cyanure de mercure. Or quelques cristaux représentent, le plus souvent, un minimum de 0 gr. 50 par litre, et pour l'infirmier, qui généralement ajoute l'antiseptique au bocal, il n'est pas rare de voir cette dose se traduire par 1 gramme ou 1 gr. 50. Comme on peut admettre que le cyanure est tout au moins aussi efficace que le biiodure de mercure, c'est, d'après MIQUEL, la quantité suffisante pour assurer la con-

servation de 20 litres d'urines ensemencées. Il est certain que, dans de telles conditions, l'emploi du cyanure de mercure rencontre de nombreux adversaires et présente divers inconvénients ; mais avec les urines conservées à l'aide de *cinq centigrammes* par litre, la majorité des ennuis signalés au cours de l'analyse par la présence d'une quantité d'antiseptique égale à 0 gr. 20 o/oo, disparaissent. Les phénomènes dus à la libération de mercure sont devenus insignifiants et tout à fait négligeables. De même le culot de centrifugation, avec les urines albumineuses ne présente plus cette pigmentation brune due au sulfure de mercure. Le pouvoir hémolytique persiste cependant, mais est bien moins marqué.

Recherche d'une correction permettant de doser les corps puriques, selon Denigès

Seul le trouble brunissant se forme d'une façon aussi intense en présence de la liqueur ammoniaco-magnésienne demi-décimale d'argent dans le procédé de DENIGÈS.

Les filtrations successives sont sans effet : le liquide filtré présente toujours cet aspect opalescent qui se confond d'une façon complète avec le trouble dû à la formation d'iodure d'argent et qui marque la fin de la réaction.

Ce trouble opalescent va même en augmentant : la combinaison du mercure avec le soufre neutre de l'urine s'effectuant, ainsi que nous l'avons montré, avec une certaine lenteur. C'est l'observation de ce phénomène qui nous a permis, après plusieurs essais infructueux de filtration sur des substances inertes et de nombreuses tentatives pour enlever le cyanure de l'urine, d'obtenir un liquide limpide se prêtant parfaitement à la perception du virage final.

Il suffit, en effet, après avoir agité vivement 100 cm³ d'urine conservée avec 25 cm³ de la solution A de DENIGÈS, d'abandonner le mélange au repos pendant trente minutes environ, en ayant soin, bien entendu, de la soustraire à l'action de la lumière. Généralement, cet intervalle de temps écoulé, la combinaison *sulfo-mercuro-argentique* est terminée, et le filtrat se prête parfaitement à l'appréciation du virage.

Nous avons pu observer, à la suite de plusieurs expériences, qu'une certaine quantité d'argent est absorbée au cours de cette réaction et se traduit ensuite par un excès de cyanure de potassium dosable. De ce fait, la quantité d'A. urique est plus élevée. Une correction est donc nécessaire pour les urines conservées au cyanure de mercure. Cette correction est indépendante de la quantité de cyanure que renferme l'urine (tout au moins pour des doses égales ou inférieures à 1 gr. par litre). Elle paraît dépendre de la teneur de l'urine en certaines formes de soufre neutre (1); nous avons cependant toujours trouvé, au cours de nombreux dosages sur des urines de concentration moyenne, un chiffre sensiblement constant. Nous allons décrire une série d'expériences plusieurs fois renouvelées et qui nous ont permis d'établir une correction fixe.

a) 100 cm³ d'urine témoin + 1 cm³ H₂O distillée nécessitent finalement 3 cm³ 5 de solution décimale d'azotate d'argent, ce qui correspond à $3,5 \times 0,21 = 0,735$ d'A. urique.

b) 100 cm³ d'urine témoin + 1 cm³ d'une solution de Cy²Hg à 10 o/o (soit 0 gr. 10 de sel mercurique) nécessitent,

(1) En collaboration avec M. le Pr^f Derrien, nous nous réservons de poursuivre nos recherches sur cette question délicate et d'un grand intérêt pathologique, en étudiant à ce point de vue les urines dans diverses formes de cancer et de tuberculose.

après 30 minutes de contact avec la solution A : 3,75 de $\text{AzO}^3\text{Ag N}/10$ soit = 0,787 A. urique.

c) 100 cm^3 d'urine témoin + 1 cm^3 Cy^2Hg à 1 o/o (0,01) après 35 minutes nécessitent : 3 cm^3 75 $\text{AzO}^3\text{Ag N}/10$ = 0,787 A. urique.

d) 100 cm^3 d'urine témoin + 1 cm^3 Cy^2Hg à 0.50 o/o (0,005) après 38 minutes nécessitent : 3 cm^3 75 $\text{AzO}^3\text{Ag N}/10$ = 0,787 A. urique.

e) 100 cm^3 d'urine témoin + 1 cm^3 H^2O distillée, après 40 minutes confirment le dosage effectué en a.

On peut donc admettre que l'intervalle de temps écoulé entre la première et la deuxième opération est sans action sur le résultat du dosage, et que l'écart observé sur les urines avec ou sans antiseptique doit bien être attribué à une rétention du sel d'argent au cours de la réaction provoquée par le cyanure mercurique. Ce dernier ferait donc preuve d'une action catalytique (?), puisque de très légères traces de ce produit amorcent la réaction.

Nous avons vérifié plusieurs fois les chiffres indiqués plus haut en nous servant, pour mesurer les diverses solutions, de burettes à robinet graduées avec précision. Avec des échantillons de concentration différente, sans cependant être hyperconcentrées, nous avons trouvé, invariablement, que des urines renfermant des doses quelconques de cyanure de Hg (de 0,05 à 1 : 1.000), nécessitent un excès de liqueur décinormale de nitrate d'argent, qui n'a jamais été inférieur à deux dixièmes de cm^3 , ou supérieur à trois dixièmes.

Il est donc nécessaire de faire subir au chiffre obtenu par la méthode HAYCRAFT-DENIGÈS, indiquant la totalité des corps puriques exprimés en acide urique, une correction égale à **cinq centigrammes**, et cela quelle que soit la dose de cyanure de mercure, dans les limites habituellement employées pour la conservation de l'urine.

Contre-indications du cyanure de mercure

Si le cyanure de mercure est l'antiseptique urologique par excellence de l'analyse courante, son action puissante sur les diastases ou enzymes (notamment l'uréase) fait prévoir qu'il devient complètement inutilisable pour la conservation des urines destinées à des expériences biologiques, ces expériences étant basées sur les propriétés spécifiques des précipitines, agglutinines, etc., qu'ARTHUS, en son précis, groupe sous le nom d'*enzymoïdes*.

C'est ainsi que l'un de nos confrères, DIACONO (1), a montré tout récemment que sa typho-uro-réaction était atténuée du fait de l'addition d'un antiseptique en général, et que le cyanure mercurique en particulier s'opposait complètement à la marche du phénomène.

Il ne faudrait pas, non plus, conserver au cyanure de Hg des urines à albumine suspecte destinées à la caractérisation de l'ovalbumine par le précipito-diagnostic.

Il est évident, pour la même raison, que cet antiseptique est incompatible avec le procédé de dosage de l'urée à l'aide de l'uréase.

D'ailleurs, en dehors de l'analyse courante, que, seule, nous avons envisagée ici, il faudra se livrer à une étude préliminaire, en vue des recherches spéciales que l'on voudrait effectuer en présence de cyanure mercurique.

Technique pratique de l'emploi du cyanure de mercure

Enfin, il est toujours délicat, pour le pharmacien, de livrer, sous forme de solution incolore et sous un petit volume, une

(1) H. Diacono. — *La Typho-Uro-Réaction*. (Thèse de Doctorat en Pharmacie. Montpellier, 1917).

substance éminemment toxique comme le cyanure de mercure. Les causes d'erreur et les accidents possibles doivent toujours être envisagés, aussi avons-nous songé à délivrer cet antiseptique sous une forme qui offre au chimiste toute sécurité.

Le comprimé ne nous a pas paru offrir des garanties suffisantes. Délivré sans aucun signe distinctif, il pouvait être confondu avec des comprimés destinés à l'usage interne. De plus, il devenait très difficile d'agglomérer sans un excipient, qui serait gênant, une quantité si minime d'antiseptique.

Nous avons préféré préparer un papier spécial. A cet effet, nous avons découpé dans une feuille de papier filtre CHARDIN des rectangles de 40 X 100 millimètres, et nous les avons imprégnés d'une solution titrée de cyanure de mercure dont voici la formule :

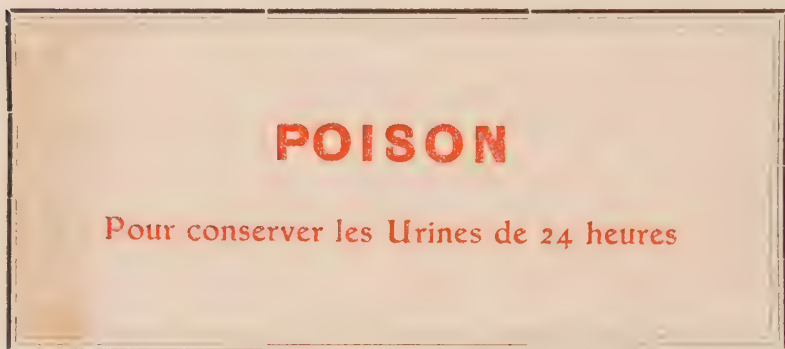
Cy ² Hg.....	10 gr.
Alcool à 90°.....	10 gr.
Glycérine.....	5 gr.
Eau distillée q. s. p.	100 cm ³

Le cyanure est dissous dans 50 cm³ d'eau distillée à 70-80°. La glycérine est ajoutée dans la solution refroidie, puis l'alcool et l'eau nécessaire pour obtenir 100 cm³ de liquide à 25°. On mesure alors, à l'aide d'une pipette, 1 cm³ de la solution, soit 0 gr. 10 de sel mercurique. Le papier est imprégné avec précaution, goutte à goutte, puis est fixé à l'aide d'une épingle sur un support en bois et séché rapidement dans un courant d'air chaud.

Ce papier cyanuré se conserve très bien à l'abri de l'humidité. La glycérine empêche une cristallisation pulvérulente qui pourrait venir se former à la surface. La solution titrée doit être dosée à une température voisine de 25°, car au-

dessous de 20° elle laisse déposer des cristaux de cyanure de mercure.

Afin de s'entourer de toutes les précautions voulues, on peut utiliser des papiers indiquant leur destination, imprimés à l'encre rouge indélébile.



Ce papier ainsi imprégné renferme une quantité suffisante d'antiseptique pour assurer la conservation des émissions totales des 24 heures. Au-dessus de deux litres d'urine, et, dans certains cas, de polyurie, on pourra remettre au malade un second papier, qui sera utilisé au besoin. Il ne peut cependant être placé d'une façon définitive au fond du récipient destiné à recevoir la totalité des urines. Il joue, en effet, le rôle du fil de GARROD et provoque, dans certaines urines, la cristallisation de l'acide urique dont il est très difficile ensuite de le séparer. De plus, le sédiment pourrait s'y déposer et échapper en partie à l'examen microscopique.

Il suffit de recommander à l'intéressé, pour éviter ces inconvénients, d'attacher le papier à l'aide d'un fil et de le retirer dès la seconde émission, après l'avoir agité au sein du liquide. Le cyanure de mercure se dissout très rapidement dans la première urine.



Mais en dehors de la conservation, même à l'aide d'une substance antiseptique, certaines précautions bien observées avant et pendant le prélèvement contribuent largement à éviter toute altération.

Il est surtout nécessaire d'insister pour que l'urine ne soit pas recueillie dans le récipient qui est habituellement destiné à cet usage. Il serait à désirer que le chimiste fournisse au malade des vases spéciaux gradués et bouchant de préférence à l'émeri. Ces récipients seraient lavés et désinfectés soigneusement après chaque analyse.

Dans ces conditions, il n'y aurait plus d'inconvénient pour le chimiste à livrer le cyanure de mercure sous forme de solution (5 cm³ d'une solution à 1 pour 50), qu'il placerait lui-même au fond du bocal.

Lorsque ces conditions ne pourront être réalisées, il faudra recommander au malade de laver soigneusement à l'eau bouillante un récipient en verre convenable et de choisir également, après l'avoir nettoyé comme précédemment, le flacon qui devra renfermer l'échantillon moyen destiné à l'analyse. .

Il sera prudent enfin, toutes les fois que le pharmacien ne pourra pas lui-même placer la solution toxique dans le bocal, de délivrer le cyanure mercurique sous la forme d'un papier imprégné, après en avoir indiqué l'emploi.

CONCLUSIONS

1° De tous les antiseptiques qui ont été préconisés dans le but de conserver l'urine aux fins d'analyse : trois seulement méritent d'être retenus et ont été, de ce fait, l'objet de nos recherches. Ce sont : le *cyanure de mercure*, le *thymol*, le *toluène*.

2° Le *cyanure* et le *thymol* présentent quelques inconvénients vis-à-vis des réactifs habituels de l'analyse. Ils ne sont pas cependant incompatibles avec l'emploi des méthodes généralement usitées. Le *thymol* seul, en diminuant la tension superficielle de l'urine, ne permet pas d'utiliser l'excellente réaction de HAY.

3° L'*examen histologique* s'accommode mal de la conservation par l'un des moyens auxquels on a le plus souvent recours. Il faut donc éviter autant que possible de retarder cet examen, et il est préférable d'utiliser, dans ce but, la centrifugation que la sédimentation par le repos. De plus, la centrifugation permet seule d'obtenir l'observation microscopique de tous les éléments figurés de l'urine examinée. Le *thymol*, mais principalement le *toluène* changent surtout après des agitations répétées du liquide, l'aspect du culot de centrifugation. Le *cyanure de mercure*, en raison d'un pouvoir hémolytique très marqué, détruit, au bout de quelques heures, les globules rouges. Il est cependant le seul agent de conservation qui permet, même après plusieurs jours, d'apprécier exactement l'importance du dépôt que présentait l'urine à l'émission.

4° Les propriétés antiseptiques respectives de ces trois substances doivent donc fixer définitivement notre choix. En soumettant les urines conservées à la température moyenne de l'été après avoir réalisé les mauvaises conditions qui président à leur prélèvement habituel, le *cyanure mercurique* seul est susceptible de s'opposer d'une façon complète au développement des nombreux microorganismes de la fermentation ammoniacale. Le *thymol* notamment se montre tout à fait insuffisant dès que l'urine, pour une raison quelconque, se trouveensemencée. *C'est uniquement par la conservation obtenue à l'aide du cyanure de mercure qu'il est possible, après plusieurs jours, de déterminer l'acidité libérable par le formol* correspondant à la valeur réelle des sels ammoniacaux et acides aminés que renfermait l'urine à l'émission, et non à une certaine quantité d'ammoniaque formée secondairement aux dépens de l'urée. *Il est le seul qui agit sur l'uréase* lorsque le ferment existe déjà dans l'urine à la suite d'une fermentation intravésicale.

5° Nous avons pu montrer l'action énergique du *cyanure de mercure* dont quelques traces suffisent le plus souvent à arrêter toute fermentation ammoniacale. Les doses généralement employées peuvent être sensiblement diminuées, et nous nous sommes arrêté, finalement, à la quantité de *cinq centigrammes par litre d'urine à conserver, soit 0 gr. 10 pour la totalité des émissions des 24 heures*.

6° A cette faible dose, la plupart des inconvénients qui résultent de l'emploi de cet antiseptique disparaissent ou sont négligeables ; seul le trouble brunissant dû à une intervention probable d'une partie du soufre neutre urinaire subsiste et vient gêner la perception du virage indiquant le terme du dosage des corps puriques dans le procédé HAYCRAFT-DENIGÈS.

7° En laissant 30 minutes environ à l'abri de la lumière le mélange urine-liqueur ammoniac-magnésienne argentique, puis, en filtrant, on se débarrasse du précipité colloïdal formé aux dépens du soufre neutre de l'urine et du mercure libéré de son association avec le cyanogène.

8° Cette combinaison sulfo-mercurique se produit en entraînant une quantité constante d'argent qui correspond finalement à un excès de *0,05 centigrammes* d'acide urique qui doit être soustrait du chiffre obtenu.

9° Pour dégager dans une certaine limite la responsabilité du pharmacien qui délivre un toxique violent sous une forme dangereuse, nous proposons l'emploi d'un papier imprégné à l'aide d'une solution titrée de cyanure de mercure, de telle façon que ce papier renferme *0,10 centigrammes* d'antiseptique. Ce papier, ainsi préparé, porterait, imprimés à l'encre rouge indélébile, sa destination et le mot « POISON ».

10° Comme les conditions de prélèvement jouent un rôle de premier plan dans la bonne conservation de l'urine, il serait à désirer, toutes les fois que la chose est possible, que le pharmacien fournisse au malade des bocal rigoureusement propres, bouchés à l'émeri, et destinés à la seule récolte des urines en vue de l'analyse chimique et de l'examen histologique.

Vu bon à imprimer :

Montpellier, le 13 juin 1917.

Le Président du jury,

D^r FONZES-DIAGON.

Vu :

Montpellier, le 14 juin 1917.

Le Directeur de l'École,

G. MASSOL

Vu et permis d'imprimer :

Montpellier, le 14 juin 1917.

Le Recteur de l'Académie,

Ant. BENOIST.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.

PREMIÈRE PARTIE

La fermentation de l'urine et ses inconvénients

	PAGES
<i>Historique de la fermentation ammoniacale</i>	2
NÉCESSITÉ D'UNE BONNE CONSERVATION.....	10
Inconvénients de la fermentation pour l'étude des constituants normaux..	10
Inconvénients de la fermentation pour l'étude des constituants anormaux.	11
Impossibilité de l'étude histologique.....	13
Importance générale d'une bonne conservation.....	13
Conservation indispensable pour la détermination exacte des plus importants rapports urologiques.....	16
Importance actuelle au point de vue militaire.....	20

DEUXIÈME PARTIE

Étude critique des antiseptiques préconisés contre la fermentation ammoniacale

Premières recherches expérimentales et cliniques.....	21
Antiseptiques préconisés en vue de l'analyse de l'urine.....	23
Études de MIQUEL sur les antiseptiques s'opposant à la fermentation ammoniacale.....	25
Inconvénients et sélection des agents conservateurs de l'urine en vue de l'analyse.....	
Moyens physiques.....	27
Antiseptiques chimiques inutilisables.....	28
Antiseptiques sélectionnés.....	34
CONSERVATION EN VUE DE L'EXAMEN MICROSCOPIQUE.....	34

TROISIÈME PARTIE

Étude expérimentale des antiseptiques sélectionnés

I. <i>Les antiseptiques et l'analyse chimique</i>	38
A. Essais préliminaires et méthodes employées pour la détermination des constituants normaux réguliers.....	40
B. Action des antiseptiques sur les déterminations précédentes.....	48
C. Action des antiseptiques sur l'étude des constituants normaux irréguliers.	53
D. Action des antiseptiques sur l'étude des constituants anormaux.....	56
II. <i>L'examen histologique</i>	67
Méthodes d'obtention des sédiments.....	67
La coagulation urinaire.....	69
Méthode de choix : la centrifugation modérée avant la coagulation.....	70

Action des antiseptiques sur l'étude du culot de centrifugation.....	71
Aspect macroscopique du culot de centrifugation.....	72
Sédiments inorganisés.....	74
Sédiments organisés.....	74
Action hémolytique du cyanure mercurique.....	75
Conservation des cylindres urinaires.....	76
III. <i>Efficacité comparée des antiseptiques contre la fermentation ammoniacale</i>	77
A. Facteurs influant sur la fermentation ammoniacale.....	78
Concentration.....	78
Réaction.....	79
Air et lumière.....	79
État clinique du malade.....	79
Température.....	80
« Bocalite ».....	81
B. Choix d'un criterium.....	81
Insuffisance de l'acidité apparente à la phénolphtaléine.....	81
Les fermentations non ammoniacales de l'urine.....	82
Criterium de choix : L'acidité libérée par le formol.....	83
C. Les 3 épreuves permettant de juger la valeur d'un antiseptique urologique	85
Conservation de l'urine bien recueillie.....	85-89
Conservation de l'urine ensemencée.....	86-90
Action antiuréasique.....	87-91-92

QUATRIÈME PARTIE

Étude complémentaire et pratique du cyanure de mercure

Choix du cyanure de mercure.....	93
Inconvénients des autres antiseptiques étudiés.....	93
Avantages décisifs du cyanure mercurique.....	95
Ses inconvénients.....	96
Détermination de la dose minima efficace.....	97
Recherche d'une correction permettant de doser les corps puriques selon	
DENIGÈS.....	103
Contre-indications du cyanure de mercure.....	106
Technique pratique de l'emploi du cyanure de mercure.....	106
CONCLUSIONS.....	110

